



Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# Evaluación de la línea genéticamente atenuada *LiΔhsp70-II* como vacuna contra la leishmaniosis cutánea y visceral en el modelo ratón

Memoria para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares

Presentada por: Jose Carlos Solana Morcillo. Licenciado en Biología.

Directores: Dr. Manuel Soto Álvarez

Dr. Jose María Requena Rolanía

Madrid, 2018

Este trabajo ha sido realizado gracias a la siguiente financiación:

Proyecto de Investigación en Salud (PI14/00366) Instituto de Salud Carlos III (Fondos FEDER)  
Proyecto de la Unión Europea (7<sup>th</sup> Framework Programme). Ref. HEALTH-F3-2013-603181



## Informe del director de la Tesis

El desarrollo de vacunas contra las leishmaniosis es un campo de investigación actual que persigue controlar la patología causada por la infección mediante la generación de una respuesta inmunitaria por la previa inoculación de determinantes parasitarios. Entre las diferentes estrategias que se están estudiando se encuentra la vacunación con cepas atenuadas, generadas por manipulación de los parásitos con técnicas de Biología Molecular. Este trabajo se centra en el estudio de las capacidades inmuno-profilácticas de una línea generada en la especie *Leishmania infantum* por delección genética del gen *hsp70-II*, codificante por una variante de la proteína HSP70, relacionada con la supervivencia del parásito en el hospedador vertebrado.

El objetivo principal de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de las capacidades profilácticas de la línea *LiΔhsp70-II*. Se buscaba detallar la respuesta inmunológica generada por su administración en diferentes cepas de ratón y empleando distintas vías de inoculación, así como estudiar la protección generada en ese modelo experimental frente a diferentes especies de *Leishmania*.

Se describe en este trabajo la respuesta celular y humoral generada por la inoculación de la cepa atenuada, caracterizada como biosegura por el control de su progresión visceral a pesar de demostrarse persistente y por lo tanto generadora de una inmunidad a largo plazo frente a cepas cutáneas y viscerales. Se determinó, además, que la capacidad protectora se asocia a la generación de respuestas efectoras tempranas contra el parásito.

Este trabajo ha dado lugar a cuatro presentaciones a sendos Congresos Científicos y, la primera parte de la investigación se publicó en la siguiente referencia:

SOLANA JC, RAMIREZ L, CORVO L, INDIANI de OLIVEIRA C, BARRAL-NETTO M, REQUENA JM, IBORRA S, SOTO M. Vaccination with a *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant confers long-term protective immunity against *Leishmania major* infection in two mice models. PLoS Negl Trop Dis. 2017. 11(5):e0005644. doi: 10.1371/journal.pntd.0005644.

La valoración de la Tesis Doctoral se puede calificar de excelente tanto por los resultados obtenidos como por el elevado grado de formación adquirida por el doctorando.

Fdo. : Manuel Soto Álvarez  
Departamento de Biología Molecular,  
Facultad de Ciencias.  
Universidad Autónoma de Madrid

Fdo. (codirector): José María Requena Rolanía  
Departamento de Biología Molecular,  
Facultad de Ciencias.  
Universidad Autónoma de Madrid.

A mis padres

# AGRADECIMIENTOS

Durante estos años han sido muchas las personas que me han ayudado de alguna u otra forma a completar esta Tesis. Quisiera recordar y destacar aquí a aquellas que han contribuido a ello de manera más especial o directa.

En primer lugar, debo expresar mi agradecimiento mis directores, el Dr. Manuel Soto y el Dr. Jose M<sup>a</sup> Requena, por darme la oportunidad de participar en el grupo de investigación y conducir este trabajo a buen término.

Quiero agradecer al Dr. Soto que me enseñara lo necesario para trabajar en un laboratorio de forma correcta y todas las técnicas que de él he podido aprender. También por su guía y su paciencia, y por darme la libertad para hacer todos los experimentos que he creído interesantes.

Al Dr. Jose María Requena quiero además agradecerle su constante dedicación, su confianza y sus consejos, por ayudarme a apreciar la buena ciencia y animarme a seguir en este camino.

Al Dr. Pedro Bonay gracias por su amabilidad y simpatía, que valoré mucho durante mis primeros meses de aclimatación a la vida del laboratorio.

Al Dr. Javier Moreno y a la Dra. Eugenia Carillo, por acogerme con gran hospitalidad durante mi breve estancia en la Unidad de Leishmaniasis del Instituto de Salud Carlos III.

Quiero dar las gracias también a la Dra. Esther Garde, por su apoyo y su paciencia para enseñar “al nuevo” a preparar geles y hacer ELISAs.

A la Laura Ramírez, compañera de penurias y domadora de ratones, por su inestimable ayuda durante mis primeros experimentos y también en esta última etapa. Sin ella no hubiera podido escribir esta memoria.

A Laura Corvo. Aunque al principio daba un poco de miedo, resultó ser la mejor compañera que he podido tener. Quiero agradecer su ayuda desinteresada, su honestidad y compañerismo, y todos sus consejos a los que no hice caso. Por obligarme a ser positivo, con relativo éxito. Por llevar al equipo MuLeVaCLin a buen puerto con una tripulación de grumetes.

A Paola quiero agradecer especialmente los buenos ratos que nos ha hecho pasar en el laboratorio durante su estancia. Por conseguir hacernos hablar durante un tiempo con acento colombiano (pues ajá) y ser una trabajadora incansable (casi) siempre con una sonrisa. Se echa de menos su compañía y su risa contagiosa.

A Esther por su compañerismo, responsabilidad y ganas de ayudar. Y también por intentar enseñar que lo que hace con su superordenador es “sencillo”. Gracias por mostrarnos los beneficios del brunch aunque se convirtiera en lunch.

También quiero recordar a otras personas que han formado parte del laboratorio, pues de todas he aprendido algo y guardo buenos recuerdos. A Miguel, por hacerme ver que las ogresas no lo eran tanto y por ser un caballero del tercio, porque tras su marcha me he visto obligado a llevar una vida abstemia. A Irene por su siempre agradable compañía y sus ánimos. A César gracias por ayudarme en mis primeros experimentos de Biología Molecular. Y a Rodrigo por sus palabras y reflexiones.

Gracias a Carmen y Raquel, del laboratorio del Dr. Manuel Fresno, por ayudarnos a hacer brillar a los ratones y sacarles unas buenas fotos artísticas en el sistema IVIS.

Gracias a Laura, a AnaVic, a Lauri, a Pame y a Carmen, de Unidad de Leishmaniasis de ISCIII, por las charlas que hemos tenido y por su compañía en los congresos que hemos compartido.

Debo agradecer al personal del CBSMO su profesionalidad y su ayuda. En especial a los servicios de Cultivos, por tener siempre todo perfectamente dispuesto, y a Juan por prepararnos los medios de cultivo y el suero en tiempo récord. A Berta, Silvia y Raquel, del Servicio de Citometría, por su simpatía y ayuda en las interminables horas de citómetro. Gracias al equipo del Animalario, a Elena y a Fernando, por su amabilidad y buena disposición, y a Julia, por cuidar de manera sobresaliente a los ratoncillos.

Gracias de todo corazón a mi familia, especialmente a mis padres, pues es por su gran esfuerzo que he podido llegar hasta aquí. No podré agradecerles lo suficiente los valores que me han transmitido y todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí. Quiero destacar el apoyo que me han dado para que pueda dedicarme a lo que me gusta, y que traten de entender las peculiares características que acompañan a este trabajo.

También quiero agradecer a mi otra familia que permitiera a su hija unirse a un individuo con la idea peregrina de dedicarse a la Biología, que me hiciera sentir como en casa y que me haya hecho ganar otra hermana.

Finalmente, gracias a Cristina. Por estar a mi lado durante tantos años y querer compartir su vida conmigo. Por ser la mejor persona que conozco y sacar lo mejor de mí. Porque me hace inmensamente feliz.

## RESUMEN

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades parasitarias que causan una gran morbilidad y mortalidad en diversas regiones del mundo. Debido a que los pacientes curados son resistentes a nuevas infecciones la vacunación se muestra como el método más eficaz para controlar la enfermedad. Sin embargo, todavía no ha sido posible aplicar una vacuna profiláctica en humanos. Algunos candidatos basados en subunidades del parásito son capaces de generar protección, pero solo a corto plazo en ausencia de dosis de recuerdo. En cambio, la leishmanización, que consiste en la inoculación en zonas ocultas de la piel de parásitos causantes de leishmaniosis cutánea, sí se ha mostrado capaz de conferir una protección robusta y duradera, pero su uso actualmente está limitado por cuestiones de bioseguridad. En ese sentido, la utilización de parásitos genéticamente atenuados se presenta como una estrategia prometedora para generar vacunas tan eficaces como la leishmanización, pero más segura. Resultados preliminares del grupo indicaron que la inoculación por vía intravenosa de una cepa deficiente en el gen *hsp70-II* de *Leishmania infantum* (*LiΔhsp70-II*) confería protección a corto plazo frente a la infección con *L. major* en ratones BALB/c.

Basados en la hipótesis de que la cepa *LiΔhsp70-II* podría ser utilizada como vacuna atenuada, en este proyecto de Tesis se han analizado las propiedades inmunogénicas y profilácticas de esta línea celular utilizando la inoculación por vía intravenosa (i.v.) y subcutánea (s.c.) en ratones BALB/c y s.c. en C57BL/6. La vacuna produce una infección asintomática y autolimitada que genera una respuesta inmunitaria celular TH1 capaz de conferir protección duradera frente a la infección con *L. major*, en ambas cepas de ratón y con *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en ratones BALB/c. Los resultados indican que el mecanismo de protección se basa en la inducción de una respuesta efectora mediada fundamentalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN-γ, que son reclutados rápidamente al sitio de infección. Así, en ratones BALB/c vacunados, tanto por vía i.v. como por vía s.c., se produce una respuesta TH1 capaz de controlar la infección contra *L. major*, reduciendo la carga parasitaria y limitando el desarrollo de la lesión cutánea. La infección con *L. major* en los ratones C57BL/6 vacunados por vía s.c. induce una respuesta rápida y moderada de IFN-γ que controla la multiplicación de los parásitos sin causar lesiones inflamatorias. La infección con *L. infantum* en ratones BALB/c vacunados por vía s.c. produce una respuesta mediada por IFN-γ que disminuye el número de parásitos y acelera la curación en el hígado. Los ratones BALB/c vacunados por vía s.c. muestran tras la infección con *L. amazonensis* o *L. braziliensis* una menor carga parasitaria y no desarrollan la patología.

Estos estudios demuestran que la línea *LiΔhsp70-II* es una vacuna segura que induce una respuesta celular suficiente como para proteger de la infección a largo plazo con varias especies causantes de las principales manifestaciones clínicas de la leishmaniosis

## SUMMARY

Leishmaniasis are a group of parasitic diseases responsible for high rates of morbidity and mortality worldwide. The fact that cured individuals become resistant to new infections indicates the feasibility of developing an effective vaccine. However, to date, there is not any prophylactic vaccine available for human use. Some candidates, based on parasite subunits have been able to confer protection, although only at a short-term in the absence of booster doses. On the other hand, leishmanization, which consists of the inoculation of live cutaneotropic parasites in hidden parts of the body, has been able to confer a robust and long-lasting protection, but its use is currently limited due to biosafety concerns. In this sense, the use of genetically attenuated parasites is a promising strategy to develop safe vaccines as effective as leishmanization. Preliminary results from our group indicated that intravenous inoculation of the *Leishmania infantum* null mutant *LiΔhsp70-II*, lacking the *hsp70-II* gene, conferred protection against an *L. major* challenge in BALB/c mice.

Based on the hypothesis that the *LiΔhsp70-II* line could be used as an attenuated vaccine, the immunogenic and prophylactic properties of this mutant line have been analysed, using either intravenous (i.v.) or subcutaneous (s.c.) inoculation routes and in two mouse models, BALB/c and C57BL/6. This vaccine produced an asymptomatic and self-limited infection that elicits a TH1 cellular immune response that is able to confer long-lasting protection against an *L. major* challenge in both mice strains. Moreover, this attenuated vaccine also protected BALB/c mice against *L. infantum*, *L. amazonensis* or *L. braziliensis* infections. The mechanism of protection relies on the establishment of an immune response mediated by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> IFN-γ-producing T cells, which are rapidly recruited to the site of infection. As a result, in intravenously or subcutaneously vaccinated BALB/c mice, a TH1 response able to control the infection by *L. major* is produced, which leads to a diminished parasite burden and limits the development of the cutaneous lesion. The infection with *L. major* in C57BL/6 mice, vaccinated by the s.c. route, induces a fast and moderate IFN-γ response that controls parasite multiplication and avoids the development of inflammatory lesions. A challenge with *L. infantum*, in BALB/c mice vaccinated by the s.c. route, leads to an IFN-γ mediated response that decreases the parasite burden and accelerates the removal of the parasite in the liver. Likewise, BALB/c mice vaccinated by the s.c. route show lower parasite burdens and no signs of pathology after a challenge with either *L. amazonensis* or *L. braziliensis* virulent parasites.

These studies support that *LiΔhsp70-II* attenuated strain would be a safe vaccine that is able to induce a robust and long-lasting cellular response, strong enough to protect vaccinated animals against the *Leishmania* species causing the main clinical forms of leishmaniasis.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Leishmaniosis y <i>Leishmania</i></b>	<b>7</b>
1.1.1. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	7
1.1.2. Formas clínicas de la enfermedad	8
1.1.3. Epidemiología de las leishmaniosis	9
<b>1.2 Inmunología de las leishmaniosis</b>	<b>11</b>
1.2.1. Modelos animales de infección experimental	11
1.2.2. Respuesta innata frente a la infección e interacción con la célula hospedadora	13
1.2.3. Linfocitos T y respuesta adaptativa	15
1.2.4. Memoria inmunitaria	19
<b>1.3. Vacunas contra la leishmaniosis</b>	<b>21</b>
1.3.1. Leishmanización y vacunas de primera generación	21
1.3.2. Vacunas de segunda y tercera generación	22
1.3.3. Vacunas atenuadas	23
1.3.4. La vacuna genéticamente atenuada de <i>L. infantum</i> $\Delta hsp70-II$	26
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Medios de cultivo</b>	<b>33</b>
3.1.1. Medio M3	33
3.1.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	33
3.1.3. Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	33
3.1.4. Medio M199	33
<b>3.2. Material biológico</b>	<b>33</b>
3.2.1. Parásitos	33
3.2.2. Animales de experimentación	34
<b>3.3. Ensayos de vacunación e infección en ratón</b>	<b>35</b>
3.3.1. Vacunación e infección de los animales	35
3.3.2. Aislamiento de promastigotes metacíclicos de <i>L. major</i>	36
3.3.3. Seguimiento de la infección	36
3.3.4. Obtención de muestras biológicas de ratón	36
3.3.5. Estimación de la carga parasitaria	37
3.3.6. Preparación del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (SLA)	38
3.3.7. Diferenciación de células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (BMDDCs) y su preparación como células presentadoras de antígenos	38
3.3.8. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> para determinar la concentración de citocinas en el sobrenadante	39
3.3.9. Condiciones de estimulación para analizar la expresión de citocinas en linfocitos T por citometría de flujo	39
3.3.10. Tinciones para citometría de flujo	40
3.3.11. Determinación del título de anticuerpos anti-SLA	41
3.3.12. Determinación de la concentración de citocinas mediante ELISA	42

3.3.13. Medida de la concentración de nitritos por el método de Griess	42
<b>3.4. Análisis estadístico</b>	<b>43</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Capacidad de inducir inmunidad protectora de la línea <i>LiΔhsp70-II</i> en ratones BALB/c y C57BL/6</b>	<b>47</b>
4.1.1. Evolución de la carga parasitaria en ratones vacunados con <i>LiΔhsp70-II</i>	47
4.1.2. Respuesta humoral en los animales vacunados con <i>LiΔhsp70-II</i>	48
4.1.3. Respuesta celular en animales vacunados con <i>LiΔhsp70-II</i>	49
4.1.4. Caracterización de los linfocitos T implicados en la respuesta celular	51
<b>4.2. Evaluación de la capacidad protectora de la vacuna <i>LiΔhsp70-II</i> frente a la infección con <i>L. major</i></b>	<b>54</b>
4.2.1. La vacunación por vía i.v. o s.c. con <i>LiΔhsp70-II</i> genera una protección duradera contra la infección por <i>L. major</i>	54
4.2.2. Respuesta inmunitaria postinfección	56
4.2.3. Respuesta temprana postinfección en ratones C57BL/6	60
4.2.4. Persistencia de parásitos <i>LiΔhsp70-II</i> en animales vacunados y su reactivación tras la infección con <i>L. major</i>	63
<b>4.3. Evaluación de la vacuna <i>LiΔhsp70-II</i> frente a la infección con <i>L. infantum</i></b>	<b>66</b>
4.3.1. <i>LiΔhsp70-II</i> confiere protección frente a la infección con <i>L. infantum</i>	66
4.3.2. La infección con <i>L. infantum</i> induce una respuesta inmunitaria temprana en el bazo de los animales vacunados	69
4.3.3. Caracterización de los linfocitos T implicados en la respuesta temprana a la infección con <i>L. infantum</i>	69
4.3.4. Análisis de la respuesta efectora temprana en los animales infectados con <i>L. infantum</i>	71
4.3.5. Aumento en la frecuencia de células dendríticas en el bazo como respuesta temprana a la infección con <i>L. infantum</i> en animales vacunados	73
<b>4.4. Protección frente a otras especies de <i>Leishmania</i></b>	<b>75</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO I. ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO II. GENERACIÓN DE UNA CEPA DEFICIENTE EN EL GEN <i>HSP70-II</i> EN <i>L. MAJOR</i></b>	<b>133</b>
<b>Anexo III. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL</b>	<b>139</b>

## ABREVIATURAS

<b>A.P.:</b>	Almohadilla Plantar.
<b>ALO:</b>	arabino-1,4-lactona oxidasa.
<b>APC:</b>	células presentadoras de antígenos profesionales ( <i>Antigen-Presenting Cell</i> ).
<b>APC-:</b>	aloficocianina.
<b>BMDDCs:</b>	células dendríticas derivadas de la médula ósea ( <i>Bone Marrow Derived Dendritic Cells</i> ).
<b>FasL:</b>	ligando de Fas.
<b>BSA:</b>	albúmina de suero bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> ).
<b>BT1:</b>	transportador de biopterina 1.
<b>BV:</b>	Brilliant Violet.
<b>CCR7:</b>	receptor de quimiocinas CC 7 ( <i>C-C chemokine receptor type 7</i> ) implicado en la migración de linfocitos a los tejidos linfoides (ganglios, bazo).
<b>CD-:</b>	grupo de diferenciación ( <i>Differentiation Cluster</i> ).
<b>cDC:</b>	células dendríticas convencionales ( <i>conventional Dendritic Cells</i> )
<b>Cen:</b>	centrina. Fosfoproteína de unión a calcio presente en los centrosomas.
<b>ConA:</b>	concanavalina A.
<b>CpA/CpB:</b>	cisteín carboxipeptidasas, tipos A y B.
<b>CpG:</b>	oligodesoxirribonucleótidos de citosina-fosfato-guanina.
<b>Cy-:</b>	cianina ( <i>Cyanine</i> ).
<b>DC:</b>	células dendríticas ( <i>Dendritic Cells</i> ).
<b>DHFR:</b>	dihidrofolato reductasa timidilato sintasa.
<b>DMEM:</b>	medio Eagle Modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ).
<b>DMSO:</b>	dimetilsulfóxido.
<b>DTH:</b>	hipersensibilidad de tipo retardado ( <i>Delayed Type Hypersensitivity</i> ).
<b>DWR:</b>	región corriente abajo ( <i>Downstream Region</i> ).
<b>ELISA:</b>	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ).
<b>FACS:</b>	clasificación de células activadas por fluorescencia ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ).
<b>Fbpase:</b>	fructosa-1,6-bisfosfatasa.
<b>FCS:</b>	suero fetal bovino ( <i>Fetal Calf Serum</i> ).
<b>FITC:</b>	isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein IsoThiocyanate</i> ).
<b>G.D.:</b>	Ganglio Drenante del sitio de infección.
<b>G418:</b>	geneticina.
<b>GDP-MP:</b>	GDP-manosa pirofosforilasa.
<b>GM-CSF:</b>	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos ( <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> ).
<b>GP63:</b>	glicoproteína de 63 kDa [metaloproteasa 63, leishmanolisina].
<b>HRP:</b>	peroxidasa de rábano picante ( <i>Horseradish peroxidase</i> ).
<b>HSP:</b>	proteína de choque térmico ( <i>Heat Shock Protein</i> ).
<b>HYG:</b>	casete de resistencia a higromicina que contiene el gen <i>hph</i> ( <i>hygromycin phosphotransferase</i> ).
<b>i.c.:</b>	vía de inoculación intracardiaca.
<b>i.d.:</b>	vía de inoculación intradérmica.
<b>i.p.:</b>	vía de inoculación intraperitoneal.
<b>i.v.:</b>	vía de inoculación intravenosa.
<b>IFN-:</b>	interferón.
<b>Ig-:</b>	inmunoglobulina.
<b>IL-:</b>	interleucina.
<b>IL7Rα(CD127):</b>	receptor de la interleucina 7 ( <i>Interleukin-7 Receptor</i> ).
<b>iNOS:</b>	óxido nítrico sintasa inducible ( <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> ).
<b>KMP-11:</b>	proteína de membrana de Kinetoplastidos de 11 kDa ( <i>Kinetoplastid Membrane Protein-11</i> ).
<b>LACK:</b>	proteína homóloga al receptor para la quinasa c activada en <i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania homolog of receptors for Activated C-Kinase</i> ).
<b>LC:</b>	Leishmaniosis Cutánea.
<b>LCD:</b>	Leishmaniosis Cutánea Difusa.
<b>LiΔ70:</b>	<i>Leishmania infantum</i> Δ <i>hsp70-II::NEO/Δhsp70-II::HYG</i> (= <i>LiΔhsp70-II</i> ).

<b>LMC:</b>	Leishmaniosis Mucocutánea.
<b>LMJ19:</b>	proteína de la saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> de 19 kDa.
<b>LPG:</b>	lipofosfoglicano.
<b>LV:</b>	Leishmaniosis Visceral.
<b>Ly6C:</b>	glicoproteína de superficie anclada a GPI regulada por el factor de transcripción T-bet ( <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i> ).
<b>Ly6G:</b>	glicoproteína de superficie anclada a GPI expresada en monocitos y granulocitos ( <i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G</i> ).
<b>M.O.:</b>	Médula Ósea.
<b>M3c:</b>	medio M3 completo.
<b>MFI:</b>	mediana de la intensidad de fluorescencia ( <i>Median Fluorescence Intensity</i> ).
<b>MHC:</b>	complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> ).
<b>moDC:</b>	células dendríticas derivadas de monocitos ( <i>monocyte-derived Dendritic Cells</i> ).
<b>NEO:</b>	casete de resistencia a geneticina que contiene el gen <i>neo</i> ( <i>amino 3'-glycosyl phosphotransferase</i> ).
<b>NETs:</b>	trampas extracelulares de neutrófilos ( <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> ).
<b>NH:</b>	nucleósido hidrolasa ( <i>Nucleoside Hidrolase</i> ).
<b>NK:</b>	células asesinas naturales ( <i>Natural killer</i> ).
<b>NTDs:</b>	enfermedades tropicales desatendidas ( <i>Neglected Tropical Diseases</i> ).
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OPD:</b>	orto-fenilendiamina.
<b>P27:</b>	proteína mitocondrial de <i>Leishmania</i> de 27 kDa que forma parte del complejo citocromo c oxidasa.
<b>PABPs:</b>	proteínas de unión al poli(A) ( <i>Poly(A) Binding Proteins</i> ).
<b>PALS:</b>	zona periarteriolar del bazo ( <i>Peri-Arteriolar Lymphoid Sheath</i> ).
<b>PBMCs:</b>	células mononucleares de sangre periférica ( <i>Peripheral Blood Mononuclear cells</i> ).
<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ).
<b>pDC:</b>	células dendríticas plasmacitoides ( <i>plasmacytoid Dendritic Cells</i> ).
<b>PE:</b>	ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> ).
<b>PKDL:</b>	leishmaniosis dérmica post-kala-azar ( <i>Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis</i> ).
<b>PLGA:</b>	ácido poli(láctico-co-glicólico) ( <i>Poly Lactic-co-Glycolic Acid</i> ).
<b>PNA:</b>	aglutinina de cacahuete ( <i>Peanut Agglutinin</i> ).
<b>PURO:</b>	casete de resistencia a puomicina que contiene el gen <i>pac</i> ( <i>puromycin N-acetyltransferase</i> ).
<b>rDC:</b>	células dendríticas reguladoras ( <i>regulatory Dendritic Cells</i> ).
<b>ROS:</b>	especies reactivas del oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ).
<b>RPMI:</b>	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> .
<b>RPMIc:</b>	medio RPMI completo.
<b>SCID:</b>	síndrome de inmunodeficiencia combinada severa ( <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> ).
<b>SIDA:</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
<b>SIR2:</b>	sirtuína-2 deacetilasa dependiente de NAD.
<b>SLA:</b>	antígeno soluble de <i>Leishmania</i> ( <i>Soluble Leishmania Antigen</i> ).
<b>SMT:</b>	esterol 24-C-metiltransferasa.
<b>spi:</b>	semanas postinfección.
<b>spv:</b>	semanas posvacunación.
<b>Tcm:</b>	linfocitos T de memoria central ( <i>T Central Memory cells</i> ).
<b>TEFF:</b>	linfocitos T efectores ( <i>T Effector cells</i> ).
<b>TEM:</b>	linfocitos T de memoria efectora ( <i>T Effector Memory cells</i> ).
<b>TEME:</b>	linfocitos T de memoria efectora temprana ( <i>T Early Effector Memory cells</i> ).
<b>TEML:</b>	linfocitos T de memoria efectora tardía ( <i>T Late Effector Memory cells</i> ).
<b>Tfh:</b>	linfocitos T foliculares ( <i>T Follicular Helper cells</i> ).
<b>TGF-β:</b>	factor de crecimiento transformante β ( <i>Transforming Growth Factor β</i> ).
<b>Th-:</b>	linfocitos T colaboradores ( <i>T helper cells</i> ).
<b>TipDC:</b>	células dendríticas convencionales ( <i>conventional Dendritic Cells</i> ).
<b>TMB:</b>	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.
<b>TMEM:</b>	linfocitos T de memoria ( <i>T memory cells</i> ).
<b>TNF:</b>	factor de necrosis tumoral ( <i>Tumoral Necrosis Factor</i> ).

<b>Treg:</b>	linfocitos T reguladores ( <i>T regulatory cells</i> ).
<b>TRM:</b>	linfocitos T residentes de memoria ( <i>T Resident Memory cells</i> ).
<b>UPR:</b>	región corriente arriba ( <i>Upstream Region</i> ).
<b>UTR:</b>	región no traducida ( <i>Untranslated Region</i> ).
<b>VIH:</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Leishmaniosis y *Leishmania*

Las leishmaniosis o leishmaniasis (Ashford, 2001) son un grupo de enfermedades parasitarias descritas desde la Antigüedad que han aparecido en la Historia bajo diversos nombres: botón de Oriente, úlcera de los chicleros, espundia, fiebre Dum-Dum o kala-azar, entre otros (Nazzaro et al., 2014, Steverding, 2017). Están provocadas por diferentes especies del género *Leishmania*, un protista de la familia Trypanosomatidae que incluye dos subgéneros de interés sanitario (*Leishmania* y *Viannia*) y se transmite a través de la picadura de insectos hematófagos de la familia Psychodidae (subfamilia Phlebotominae) llamados moscas de la arena o flebótomos (Bañuls et al., 2007, Akhoundi et al., 2016).

### 1.1.1. Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo biológico de *Leishmania* presenta dos formas vitales e incluye a dos hospedadores (Figura 1.1). La forma promastigote es alargada, flagelada, extracelular, y se encuentra en el aparato digestivo del insecto vector. Los parásitos se desarrollan en el intestino y migran hacia las glándulas salivales y la probóscide del flebótomo en un proceso denominado metaciclogénesis (Sacks and Perkins, 1984, Bates, 2007). Durante este proceso, los promastigotes detienen su replicación y adquieren las características que les permitirán ser infectivos y soportar los cambios de pH y temperatura que encontrarán en el hospedador vertebrado (da Silva and Sacks, 1987, Zilberstein and Shapira, 1994, Sibley, 2011).

En el mamífero, durante la picadura del insecto se introducen, mezclados con los componentes de la saliva, los promastigotes metacíclicos, los cuales son internalizados por células fagocíticas en una vacuola parasitófora. La vacuola parasitófora se fusiona con los lisosomas y se transforma en un fagolisosoma, lo que conduce a una acidificación del medio y a la exposición a hidrolasas lisosomales (Kaye and Scott, 2011). Para sobrevivir en este entorno, los promastigotes se diferencian a la forma amastigote, intracelular, redondeada y con el flagelo no visible (Zilberstein and Shapira, 1994). Los amastigotes se multiplican hasta alcanzar un elevado número, provocando la lisis de la célula. Los parásitos liberados entran rápidamente en nuevas células fagocíticas, repitiéndose el proceso al tiempo que se expande la infección (Kaye and Scott, 2011). Para cerrar el ciclo, cuando los flebotominos se alimentan de un vertebrado infectado, provocan pequeños desgarros en la piel que hacen fluir la sangre hacia la superficie, que será ingerida por el insecto junto con macrófagos infectados. En el intestino del vector, el cambio drástico de las condiciones del entorno, bajada de temperatura e incremento del pH, provoca la diferenciación de los amastigotes de nuevo a la forma promastigote (Kamhawi, 2006).

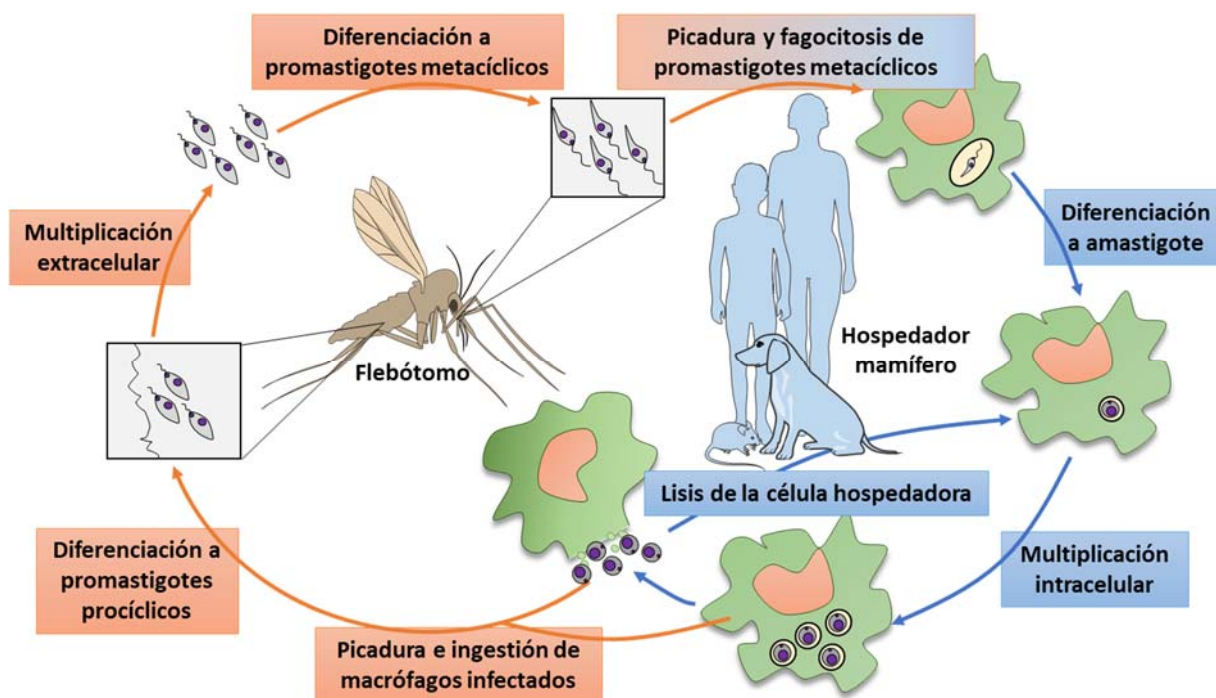


Figura 1.1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

### 1.1.2. Formas clínicas de la enfermedad

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis son diversas y dependen principalmente de la especie infectante (Tabla 1.1), aunque el estado inmunológico del hospedador y su predisposición genética desempeñan un papel muy importante, pudiendo aparecer o no los síntomas e incluso variar el tipo de enfermedad (Ashford, 2000, Harrison et al., 2017, Aliaga et al., 2003).

**Leishmaniosis cutánea (LC).** Es la consecuencia de una respuesta inflamatoria local frente a la infección, que frecuentemente en unas pocas semanas evoluciona a la formación de una pápula donde se multiplica el parásito, seguida por un proceso de ulceración que termina, al cabo de varios meses, resolviéndose y regenerando la piel, aunque a menudo dejando una cicatriz. Este tipo de leishmaniosis, cuya infección se limita a la piel y cura espontáneamente, es la más frecuente y menos grave de las formas clínicas de leishmaniosis, y todas las especies patogénicas de *Leishmania* pueden producirla (McGwire and Satoskar, 2014). En algunas ocasiones, la infección con *L. amazonensis* o *L. aethiopica* produce una **leishmaniosis cutánea diseminada (LCD)** en la que aparecen lesiones nodulares diseminadas que no curan debido a una escasa respuesta inmunitaria a la infección (Reithinger et al., 2007).

**Leishmaniosis mucocutánea (LMC).** En algunos casos, la infección con algunas especies americanas, principalmente *L. braziliensis*, produce múltiples lesiones en las mucosas bucales y nasales tiempo después de la desaparición de la lesión cutánea, lo que provoca mutilaciones como



consecuencia de la destrucción de la piel y las mucosas afectadas si no se instaura tratamiento (de Oliveira and Brodskyn, 2012).

**Leishmanosis visceral (LV) o kala-azar.** Es la forma más grave de la enfermedad y está asociada con la infección por *L. donovani* y *L. infantum* (syn. *L. chagasi* (Dantas-Torres, 2006)). Los parásitos invaden tejidos ricos en células fagocíticas como el hígado, el bazo y la médula ósea, provocando la disfunción de los mismos (Stanley and Engwerda, 2007). La infección causa fiebre, pérdida de peso, hipergammaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, leucopenia y anemia, y suele ser mortal en ausencia de tratamiento (Faleiro et al., 2014). En África oriental e India se puede observar la llamada **leishmaniosis dérmica poskala-azar (PKDL)**; lesiones maculares, papulares o nodulares que aparecen, especialmente en la cara, en individuos curados de una leishmaniosis visceral y que suponen una fuente constante de contagio y reservorio principal de leishmaniosis en India (Ganguly et al., 2010).

En el perro, la leishmaniosis visceral está asociada a la infección con *L. infantum*. Existe una alta prevalencia de infección en las zonas endémicas, aunque en la mayor parte de los casos no se produce sintomatología (Baneth et al., 2008). Es una enfermedad sistémica que puede presentar distintas afecciones, desde lesiones cutáneas localizadas a una disfunción renal y hepática, esplenomegalia, artritis o atrofia muscular, entre otras (Baneth et al., 2008, Reguera et al., 2016).

Forma clínica	África, Europa y Asia	América
<b>Leishmaniosis cutánea</b>	<i>Leishmania (L.) tropica</i>	<i>Leishmania (L.) mexicana</i>
	<i>Leishmania (L.) major</i>	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
	<i>Leishmania (L.) aethiopica</i>	<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i>
	<i>Leishmania (L.) infantum</i>	<i>Leishmania (V.) peruviana</i>
<b>Leishmaniosis cutánea difusa</b>	<i>Leishmania (L.) aethiopica</i>	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>
<b>Leishmaniosis mucocutánea</b>		<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
		<i>Leishmania (V.) guayanensis</i>
		<i>Leishmania (V.) panamensis</i>
<b>Leishmaniosis visceral</b>	<i>Leishmania (L.) donovani</i>	<i>Leishmania (L.) infantum</i>
	<i>Leishmania (L.) infantum</i>	

**Tabla 1.1.** Principales agentes etiológicos de las distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniosis (McGwire and Satoskar, 2014, Pace, 2014).

### 1.1.3. Epidemiología de las leishmaniosis

Las leishmaniosis se incluyen en la lista de las 17 enfermedades tropicales desatendidas que afectan a más de 1000 millones de personas y que causan desfiguraciones, imposibilidad de trabajar o ir a la escuela, estigmatización social y la muerte en países en vías de desarrollo (Yamey and Torreele,

2002, Alvar et al., 2006). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad afecta a 12 millones de personas de 98 países, y cada año se producen 1,3 millones de casos, de los cuales 300.000 son casos de leishmaniosis visceral que ocasionan entre 20.000 y 50.000 muertes (WHO, 2017). Hay que tener en cuenta que existe un gran número de casos no declarados (Alvar et al., 2012). Además, se estima que la mayoría de las infecciones permanecen asintomáticas (Singh et al., 2014).

### **1.1.3.1. Distribución geográfica**

La distribución de la enfermedad está ligada a la del vector transmisor. Los flebotominos se encuentran en regiones intertropicales y templadas de todo el mundo (Dostalova and Volf, 2012). Más de 90 especies de los géneros *Phlebotomus* (en África, Asia y Europa) y *Lutzomyia* (en América) pueden transmitir la enfermedad (Bates et al., 2015). El 75% de los casos de leishmaniosis cutánea ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Irak y Siria; mientras que 90% de los casos de leishmaniosis visceral ocurren en Brasil, India, Somalia, Sudán del Sur, Sudán, Etiopía, Kenia y Somalia. La leishmaniosis mucocutánea ocurre fundamentalmente en habitantes de Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú (WHO, 2017).

La leishmaniosis es por lo general una zoonosis en la que el reservorio de la enfermedad son mamíferos salvajes o domésticos, roedores y perros (Ashford, 1996, Travi et al., 2018). Sin embargo, la infección con *L. tropica* y *L. donovani* es antroponótica (Pace, 2014) y el reservorio principal lo constituyen los enfermos, los afectados de poskala-azar y también individuos asintomáticos (Bern et al., 2008).

España es un país endémico en el que el perro es el principal reservorio de *L. infantum*, que causa generalmente una forma seca de leishmaniosis cutánea o una leishmaniosis visceral en niños o pacientes infectados con VIH (Gil-Prieto et al., 2011). Entre los años 2009-2012 se produjo un brote de leishmaniosis cutánea y visceral en un parque forestal periurbano de la Comunidad de Madrid (Arce et al., 2013) asociado a la elevada concentración de flebótomos, conejos y liebres que, en este caso, sirvieron como reservorio de la enfermedad (Molina et al., 2012, Gonzalez et al., 2017, Carrillo et al., 2013). En Europa la enfermedad se considera emergente (Ready, 2010), debido a la reaparición de brotes (Christodoulou et al., 2012) y la detección de casos autóctonos en regiones distintas a las habituales (Varani et al., 2013, Naucke et al., 2008), asociados a una redistribución del vector y el reservorio (Medlock et al., 2014, Prudhomme et al., 2015, Baylis, 2017).

### **1.1.3.2. Medidas de control y tratamiento**

El control de la leishmaniosis consiste fundamentalmente en evitar la transmisión mediante insecticidas, repelentes y mosquiteras, pero cuando existen brotes o una situación de riesgo de la salud pública, también se toman medidas de control de los animales infectados que sirven como reservorio

(WHO, 2010). El sacrificio de perros infectados, aunque se ha practicado como medida de control en algunos países como Brasil, ha demostrado no ser realmente eficaz (Otranto and Dantas-Torres, 2013, Miro et al., 2017).

Cuando aparecen los síntomas clínicos debe confirmarse el diagnóstico, bien de forma parasitológica o serológica. La detección directa puede realizarse mediante la observación de los amastigotes en muestras del paciente, la diferenciación de promastigotes en el cultivo del tejido o la detección de ADN del parásito por PCR (WHO, 2010). El diagnóstico indirecto mediante técnicas serológicas es mucho más habitual, ya que además puede realizarse en los centros de atención primaria. Entre ellos cabe destacar el test para la detección de anticuerpos frente a la proteína rK39 de *Leishmania*, muy utilizado para el diagnóstico de pacientes con leishmaniosis visceral (Burns et al., 1993, Maia et al., 2012).

El tratamiento de los pacientes enfermos de leishmaniosis depende de las recomendaciones específicas para cada región o país y está basado en la quimioterapia antiparasitaria (WHO, 2010). Desde comienzos del siglo XX se vienen utilizando antimoniales pentavalentes (Pentosam® y Glucantime®), si bien tienen una elevada toxicidad y en los últimos años se ha producido un gran incremento en la aparición de cepas de parásitos resistentes (Hefnawy et al., 2017). Actualmente, estos fármacos están siendo sustituidos o complementados con otros, como la paromomicina, la anfotericina B o la miltefosina (McGwire and Satoskar, 2014), pero también tienen importantes problemas de toxicidad, resistencia o coste. Además, solo la miltefosina se administra vía oral y el resto es por vía parenteral, lo que hace más difícil la adhesión al tratamiento (Sundar et al., 2006). No obstante, hay que destacar que el uso actual de anfotericina B liposomal (AmBisome®) suministrada en una sola dosis está resultando clave en el control de la enfermedad en India (Singh et al., 2016).

## **1.2. Inmunología de las leishmaniosis**

Las características y la magnitud de la respuesta inmunitaria generadas frente al parásito están relacionadas con las diversas patologías y manifestaciones clínicas que se presentan en las leishmaniosis (Scott and Novais, 2016, Gollob et al., 2014). Los modelos experimentales, junto con los datos obtenidos de pacientes, han permitido conocer muchos de los mecanismos relacionados con la inmunopatología de esta enfermedad.

### **1.2.1. Modelos animales de infección experimental**

El ratón es el modelo experimental clásico, especialmente adecuado para estudiar la respuesta inmunitaria dada la gran disponibilidad de reactivos comerciales para el análisis de diversos tipos celulares y factores inmunológicos, y ha servido para investigar importantes aspectos de la respuesta

inmunitaria asociados con el control o el desarrollo de la leishmaniosis (Sacks and Melby, 2015, Loeuillet et al., 2016).

La infección experimental con *L. major* en ratón establece una asociación clara entre resistencia y susceptibilidad con el tipo de respuesta celular, determinada por la población de linfocitos CD4<sup>+</sup> colaboradores que es activada, tipo 1 (TH1) o tipo 2 (TH2), respectivamente (Sacks and Noben-Trauth, 2002, Gummy et al., 2004). Los ratones BALB/c infectados por vía subcutánea (s.c.) con *L. major* desarrollan una respuesta TH2, caracterizada por la producción de elevados niveles de interleucina-4 (IL-4) y una respuesta humoral que no es protectora. Como resultado, el parásito se multiplica en el sitio de infección y posteriormente se expande a las vísceras, provocando finalmente la muerte del animal (Sacks and Melby, 2015). Sin embargo, la mayoría de cepas (C57BL/6, C3H, CBA) desarrollan una respuesta mediada por linfocitos CD4<sup>+</sup> TH1 productores de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), citocina que activa a los macrófagos infectados para la destrucción del parásito (Belkaid et al., 2000). En estos ratones, los parásitos son contenidos en el sitio de infección, donde aparece una lesión inflamatoria que cura espontáneamente, de forma similar a lo que ocurre en humanos infectados con *L. major*.

Los modelos experimentales empleados para estudios con especies viscerotrópicas (*L. infantum* y *L. donovani*) son principalmente el hámster y el ratón. El ratón muestra una resistencia natural a la infección con estas especies, mientras que el hámster es muy susceptible y presenta síntomas similares a los observados en humanos y perros (Nieto et al., 2011). Según algunos autores, el ratón es un buen modelo de estudio de la inmunopatogénesis en la fase inicial y la infección subclínica crónica, pero no tanto de los síntomas clínicos asociados la infección visceral progresiva asociada a los síntomas clínicos (Sacks and Melby, 2015, Wilson et al., 2005). Un hecho característico de la infección con especies viscerotrópicas en ratón es que dos de los tejidos más afectados, hígado y bazo, tienen un comportamiento distinto en cuanto a la respuesta inmunitaria y el control de la multiplicación del parásito (Stanley and Engwerda, 2007, Faleiro et al., 2014). Tras la inoculación intravenosa (i.v.) de *L. donovani* en ratones BALB/c, la inmensa mayoría de promastigotes son capturados y destruidos por los macrófagos del bazo (Gorak et al., 1998), mientras que en el hígado se establece durante las primeras semanas una infección en las células de Kupffer (Stanley and Engwerda, 2007). Sin embargo, el reclutamiento de monocitos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) y, especialmente, linfocitos T activados, que rodean a las células de Kupffer infectadas, permite la formación y activación del granuloma, lo que conduce a la generación de una potente respuesta leishmanicida en este órgano (Moore et al., 2013). Paradójicamente, mientras en el hígado se aclara la infección, en el bazo y la médula ósea la respuesta inmunitaria no es capaz de controlar la multiplicación del parásito y se establece una infección crónica, que se acompaña de esplenomegalia, un aumento de la actividad hematopoyética y la desorganización de la arquitectura del tejido linfoide

debido a una respuesta inflamatoria ineficaz que agrava la patología (Rodrigues et al., 2016b, Kaye et al., 2004, Engwerda et al., 2004).

Además del fondo genético del hospedador, la dosis de parásitos, el lugar y la vía de inoculación tienen una gran importancia en el desarrollo de la infección en ratón (Blackwell et al., 2009, Loeuillet et al., 2016). Actualmente, existe un gran interés en realizar infecciones lo más parecidas posible a la infección natural, incluyendo la saliva de la mosca, que tiene importantes propiedades inmunomoduladoras, inoculación de bajas dosis de parásitos metacíclicos o directamente realizar infecciones con flebótomos parasitados (Peters et al., 2009).

En la Tabla 1.2 se resume la patología y la respuesta inmunitaria asociada a la infección con distintas especies de *Leishmania* en las dos cepas de ratón habitualmente utilizadas como modelo experimental.

<i>Leishmania</i> spp.	Patología en humanos	Patología en ratón			
		Ratón C57BL/6		Ratón BALB/c	
		Tipo de enfermedad	Respuesta inmunitaria dominante	Tipo de enfermedad	Respuesta inmunitaria dominante
<i>L. major</i>	LC	Autolimitante	TH1	Crónica y progresiva	TH2
<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD	Crónica	TH1 y TH2	Crónica	TH2
<i>L. mexicana</i>	LC, LCD	Crónica	TH1 y TH2	Crónica	TH2
<i>L. braziliensis</i>	LC, LMC	Autolimitante	TH1	Autolimitante	TH1
<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	LV	Crónica con cura (órgano-dependiente)	TH1 y TH2	Crónica sin cura (órgano-dependiente)	TH1 y TH2

**Tabla 1.2. Principales patologías causadas por *Leishmania* spp. en modelos experimentales de ratón.** Adaptado de (Sacks and Melby, 2015, Scott and Novais, 2016, Loeuillet et al., 2016).

### 1.2.2. Respuesta innata frente a la infección e interacción con la célula hospedadora

Los promastigotes metacíclicos introducidos en la piel por la picadura del flebótomo resisten la acción lítica del complemento y son rápidamente fagocitados por los macrófagos y células de Langerhans del entorno (Mougneau et al., 2011) mediante mecanismos de opsonización o la interacción con moléculas del parásito (Sibley, 2011, Lodge and Descoteaux, 2005). En la Figura 1.2 se presenta un esquema general de la respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania*.

Los macrófagos son las células hospedadoras principales de *Leishmania* y también las responsables de su eliminación. La destrucción de los parásitos fagocitados se produce por la acción de las especies reactivas del oxígeno (ROS), generadas por la NADPH oxidasa fagosomal, y al óxido

nítrico (NO) producido por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Para ello, los macrófagos deben ser activados por IFN- $\gamma$ , producido por linfocitos TH1 y células NK, y la producción autocrina del factor de necrosis tumoral (TNF) (Liu and Uzonna, 2012). Para combatir estas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, *Leishmania* produce altos niveles de moléculas antioxidantes (tripanotión y otros tioles), y algunos componentes del glicocálix como el lipofosfoglicano LPG y la metaloproteasa GP63 parecen apantallar el efecto de estos radicales e interferir con los sistemas de generación de ROS (Sardar et al., 2013, Alcolea et al., 2016, Cecilio et al., 2014). Por otro lado, la acción mediada por citocinas propias de la respuesta TH2 y reguladora como IL-4, IL-13, IL-10 o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), resulta en la inhibición de la producción de NO en el macrófago (Kaye and Scott, 2011, Liu and Uzonna, 2012). Asimismo, en el contexto de la respuesta TH2, se produce un aumento en la actividad de la enzima arginasa en los macrófagos infectados (Iniesta et al., 2002), que va a competir por la L-arginina, que es el sustrato de la iNOS (Muxel et al., 2017). Además, en esta competición por el sustrato participa la propia actividad arginasa de *Leishmania*, enzima que está implicada en la biosíntesis de poliaminas esenciales para la multiplicación del parásito.

Los neutrófilos llegan rápidamente tras la picadura del flebótomo debido al daño tisular que se genera y son parasitados (Peters et al., 2008, Thalhoffer et al., 2011, Gueirard et al., 2008). Su papel en el desarrollo de la enfermedad depende de la especie infectante y el fondo genético del hospedador (Scott and Novais, 2016, Gupta et al., 2013, Charmoy et al., 2007). Aunque la formación de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) parece estar destinada a impedir la propagación del parásito (McFarlane et al., 2008, de Souza Carmo et al., 2010, Novais et al., 2009), los neutrófilos infectados experimentan un proceso de apoptosis que conduce a su adquisición por parte de los macrófagos. Esta vía de entrada favorece la infección en el macrófago debido a que, por un lado, los parásitos no interaccionan directamente con la membrana del macrófago y alcanzan el interior de la célula sin provocar su activación y, por otro lado, la adquisición de los cuerpos apoptóticos promueve que el macrófago sea más permisivo al crecimiento del parásito (Ribeiro-Gomes et al., 2012, Laskay et al., 2008). Además, Los neutrófilos infectados en proceso de apoptosis también son capturados por células dendríticas, lo que produce un efecto inmunosupresor (Ribeiro-Gomes et al., 2012, Feijo et al., 2016, Hurrell et al., 2015, Ribeiro-Gomes et al., 2015).

Monocitos y células dendríticas son reclutados al sitio de infección días después de la llegada de los neutrófilos (Goncalves et al., 2011, Charmoy et al., 2010). Las células dendríticas tienen un papel central en la organización de la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania* (Feijo et al., 2016, von Stebut and Tenzer, 2017). Tras entrar en contacto con el antígeno, las células dendríticas inactivas maduran y se desplazan a las zonas ricas en linfocitos T de los órganos linfoides secundarios (ganglios y zona periarteriolar del bazo) para presentar el antígeno y modular el tipo de respuesta adaptativa que se va a producir (Ashok and Acha-Orbea, 2014, Feijo et al., 2016, Ato et al., 2006). Existen dos grandes grupos

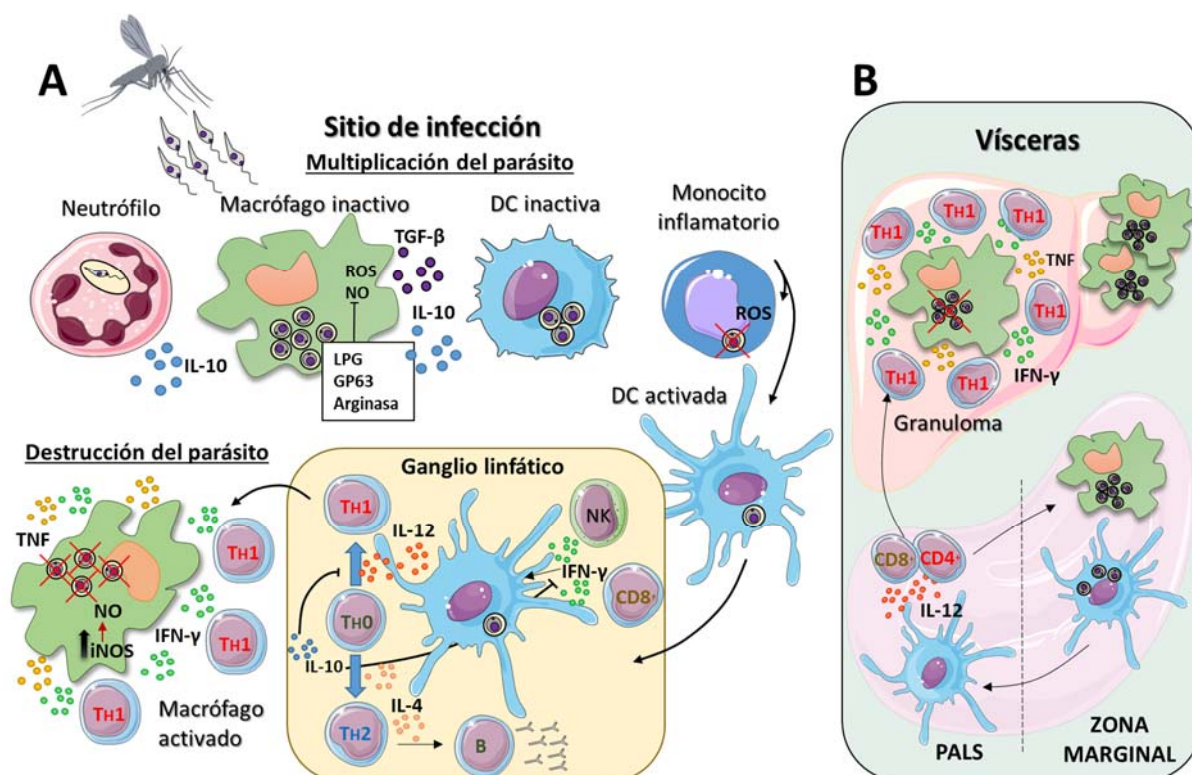
de células dendríticas en ratón: convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC). Las células dendríticas convencionales se encuentran en tejidos linfoides, se caracterizan por un alto nivel de expresión de MHC-II y CD11c, y están especializadas en la presentación antigénica y la activación de linfocitos T (Wilson and O'Neill, 2003, Mildner and Jung, 2014). A su vez, las cDCs se subdividen en CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, asociadas a la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, que son productoras de IL-12 y capaces de realizar la presentación cruzada a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Ashok and Acha-Orbea, 2014, Martínez-López et al., 2015, Henri et al., 2002). Las pDCs (MHC-II<sup>lo</sup>CD11c<sup>int</sup>CD11b<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup>) circulan por la sangre y órganos linfáticos y producen IFNs tipo I (IFN- $\alpha$  y IFN- $\beta$ ). Aunque no se ha estudiado en profundidad su implicación en la respuesta frente a la infección con *Leishmania*, existen datos que sugieren una importancia en el desarrollo de una respuesta innata adecuada (Remer et al., 2007, Guillerey et al., 2012).

Se ha sugerido un papel protector de los monocitos, debido principalmente a su capacidad para producir ROS sin necesidad de la activación previa que requieren los macrófagos (Novais et al., 2014, Goncalves et al., 2011). Además, muchos monocitos que son reclutados al sitio de infección adquieren la capacidad presentadora de antígenos y se diferencian a células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs), también denominadas células dendríticas inflamatorias, que se caracterizan por su fenotipo MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> y, en algunos casos, por la producción de TNF y NO (TipDCs, *TNF- $\alpha$  iNOS-Producing DCs*) (De Trez et al., 2009). Son una fuente de IL-12, que conduce a la activación de las células NK (Schleicher et al., 2007) y a la diferenciación de linfocitos TH1 productores de IFN- $\gamma$  (León et al., 2007, De Trez et al., 2009). La correcta migración y activación de las células dendríticas es clave para el desarrollo de una respuesta protectora, y algunas de las estrategias desarrolladas por *Leishmania* están orientadas a impedirla (Iborra et al., 2016, Cecilio et al., 2014, Gupta et al., 2013).

En los experimentos en los que la infección se realiza por vía i.v., los parásitos pueden alcanzar la médula ósea, el hígado y el bazo donde son rápidamente fagocitados por los macrófagos y células dendríticas residentes, que inician la respuesta adaptativa (Engwerda et al., 2004).

### 1.2.3. Linfocitos T y respuesta adaptativa

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta inducida frente a *Leishmania* se ha estudiado fundamentalmente utilizando el modelo ratón, lo que ha permitido establecer el papel desempeñado por las distintas poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que se diferencian fundamentalmente en base al tipo de citocinas que secretan y que van a modular la respuesta (Zhu et al., 2010). Así, en el modelo de infección con *L. major* en el ratón C57BL/6, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son estimulados en presencia de IL-12, producida por las células presentadoras de antígenos (APCs), lo que favorece su diferenciación en linfocitos TH1, caracterizados por la producción de citocinas inflamatorias como



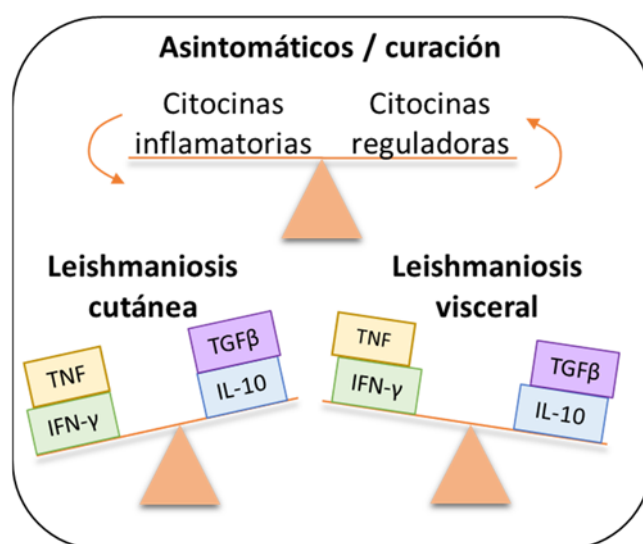
**Figura 1.2. Esquema general de la respuesta inmunitaria frente a la infección por *Leishmania* en el modelo experimental de ratón.** (A) Los promastigotes son capturados en la piel por distintas poblaciones de células fagocíticas, se diferencian a amastigotes y se multiplican. Los monocitos reclutados son capaces de eliminar al parásito y además pueden diferenciarse a DC, que migran al ganglio linfático drenante y presentan antígenos de *Leishmania* a linfocitos T. En presencia de IL-12, se diferencian a linfocitos TH1, que migran al sitio de infección y promueven la activación de los macrófagos a través de la acción del IFN- $\gamma$ . Por el contrario, la presencia de IL-10 o IL-4 durante la presentación antigénica inhibe la respuesta inflamatoria y genera linfocitos TH2, que inducen una respuesta mediada por anticuerpos. (B) Si la infección progresa hacia las vísceras, los parásitos son capturados por los macrófagos y DC de la zona marginal del bazo y las células de Kupffer en el hígado. Las DC migran a la zona periarteriolar del bazo (PALS) rica en linfocitos T, donde producen IL-12 y realizan la presentación antigénica. Los linfocitos T activados migran al hígado, donde ayudan a formar y activar el granuloma para destruir el parásito.

IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 que contribuyen a la activación de los macrófagos y la eliminación del parásito. En los ratones susceptibles BALB/c, se produce una activación de linfocitos T productores de IL-4, lo que conduce a una respuesta TH2 en la que se secretan niveles elevados de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, relacionadas con la inducción de una respuesta humoral (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Sin embargo, el paradigma clásico de resistencia o susceptibilidad TH1/TH2 en ratones infectados con *L. major* no permite explicar muchos de los resultados obtenidos con otras especies de *Leishmania* que causan leishmaniosis cutánea o visceral, lo que ha llevado a la definición de esquemas más complejos que incluyen más linajes de linfocitos T: TH17, TH9, colaboradores foliculares (TFH) o reguladores (TREG), entre otros (Alexander and Brombacher, 2012, Stager et al., 2003).

En general, la respuesta protectora frente a la infección con especies que causan leishmaniosis cutánea o visceral depende del desarrollo de una respuesta celular TH1, mientras que la susceptibilidad



parece estar asociada con la inducción de una respuesta anti-inflamatoria o reguladora que impide el pleno desarrollo de la respuesta TH1, al tiempo que favorece la persistencia del parásito (Nylen and Sacks, 2007) (Figura 1.3). La IL-10 desempeña un papel clave en la modulación de la respuesta inmunitaria; esta citocina es producida principalmente por linfocitos TREG (Belkaid et al., 2002a), pero también por otros muchos tipos celulares como linfocitos TH1 (Anderson et al., 2007, Nylen et al., 2007), linfocitos CD8<sup>+</sup> (Ronet et al., 2010), células NK (Maroof et al., 2008), células dendríticas reguladoras (rDCs) (Nguyen Hoang et al., 2010), macrófagos (Miles et al., 2005) y neutrófilos (Charmoy et al., 2007). La modulación de la respuesta inflamatoria es muy importante, ya que parte de la patología asociada a la infección por *Leishmania* se debe a la propia respuesta inflamatoria (Katara et al., 2012, Bacellar et al., 2002). Así, se piensa que en las leishmaniosis cutáneas las lesiones son el resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada y que, tras la diseminación que ocurre en la leishmaniosis visceral, una respuesta inflamatoria descontrolada e ineficaz causa la destrucción y pérdida de la arquitectura del bazo, lo que agrava la patología (Kedzierski and Evans, 2014, Gollob et al., 2014). Por otro lado, la producción de IL-10 va a permitir la persistencia y proliferación del parásito en órganos más permisivos como el bazo y la médula ósea (Rodrigues et al., 2016b, Nylen and Sacks, 2007).



**Figura 1.3. El balance entre las respuesta inflamatorias y reguladora condiciona el tipo de patología.** Además de la especie de *Leishmania* infectante, la polarización hacia un extremo u otro de la respuesta inmunitaria es un factor clave en el desarrollo de la enfermedad. Así, una inflamación exacerbada produce las lesiones propias de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea, mientras que la polarización hacia la respuesta reguladora está asociada con la multiplicación del parásito y el desarrollo de leishmaniosis visceral. En los individuos asintomáticos o en los que la enfermedad se cura existe un equilibrio que permite el control de la infección a la vez que impide el daño inflamatorio.

Cuando los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son activados en la respuesta específica a *Leishmania*, se diferencian a linfocitos T efectores, con capacidad citotóxica y de producir IFN- $\gamma$  y TNF (Stager and Rafati, 2012), y se han asociado tanto a la protección como a la patología en leishmaniosis cutánea (Novais and Scott, 2015). En el modelo de ratón, en determinadas condiciones, son necesarios para la protección frente a *L. major* (Belkaid et al., 2002b) debido a su capacidad para producir IFN- $\gamma$ , que ayuda a establecer una respuesta TH1 (Uzonna et al., 2004a, Scott et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentes en el lugar de la lesión cutánea producida por *L. major* no son capaces de producir IFN- $\gamma$  (Novais et al., 2018). Además, en la infección con *L. braziliensis*, en la que la patología está muy relacionada con la inflamación y el daño tisular, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son reclutados en gran número al sitio de infección pero no producen IFN- $\gamma$ , sino que únicamente tienen una acción citotóxica mediada por granzimas y perforinas, y parecen ser responsables del desarrollo y metástasis de las lesiones (Novais et al., 2013, Santos Cda et al., 2013). En los modelos de ratón infectados con *L. donovani* o *L. infantum* se ha descrito la importancia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la protección, debido a que son una fuente de IFN- $\gamma$ , colaboran en la formación del granuloma en el hígado (Murray et al., 2015), y eliminan células infectadas y reguladoras mediante la producción de granzimas y perforinas y la vía Fas/FasL (Stager and Rafati, 2012, Rodrigues et al., 2016b).

La respuesta humoral mediada por linfocitos B, de mayor magnitud durante la leishmaniosis visceral, se asocia habitualmente con patología, aunque existen algunos autores que indican que su papel puede ser también protector (Rodrigues et al., 2016b, Gardinassi and de Miranda Santos, 2016). Así, la hipergammaglobulinemia es uno de los síntomas de la leishmaniosis visceral activa, y la gran cantidad de anticuerpos IgG que se detectan en fases avanzadas de la enfermedad favorecen la multiplicación del parásito (Deak et al., 2010, Miles et al., 2005). Por ejemplo, los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo y los propios amastigotes opsonizados con anticuerpos IgG pueden unirse al receptor Fc de los macrófagos, lo que induce la producción de IL-10 e impide la producción de IL-12 (Kane and Mosser, 2001, Nylén and Sacks, 2007). Sin embargo, se ha descrito que, dependiendo de la cantidad y la subclase de los anticuerpos IgG, y del receptor Fc al que se unan, pueden inducirse respuestas proinflamatorias o antiinflamatorias (Gallo et al., 2010, Williams et al., 2014, Woelbing et al., 2006). Por otro lado, la destrucción de la arquitectura del bazo durante la fase crónica de infección lleva consigo la pérdida de los linfocitos T<sub>H</sub> encargados de coordinar la respuesta humoral (Crotty, 2014) y, a su vez, un cambio en el fenotipo de los linfocitos B que parece ser responsable de la formación de los inmunocomplejos, la hipergammaglobulinemia y la patología asociada a la respuesta humoral en la leishmaniosis visceral (Rodrigues et al., 2014).

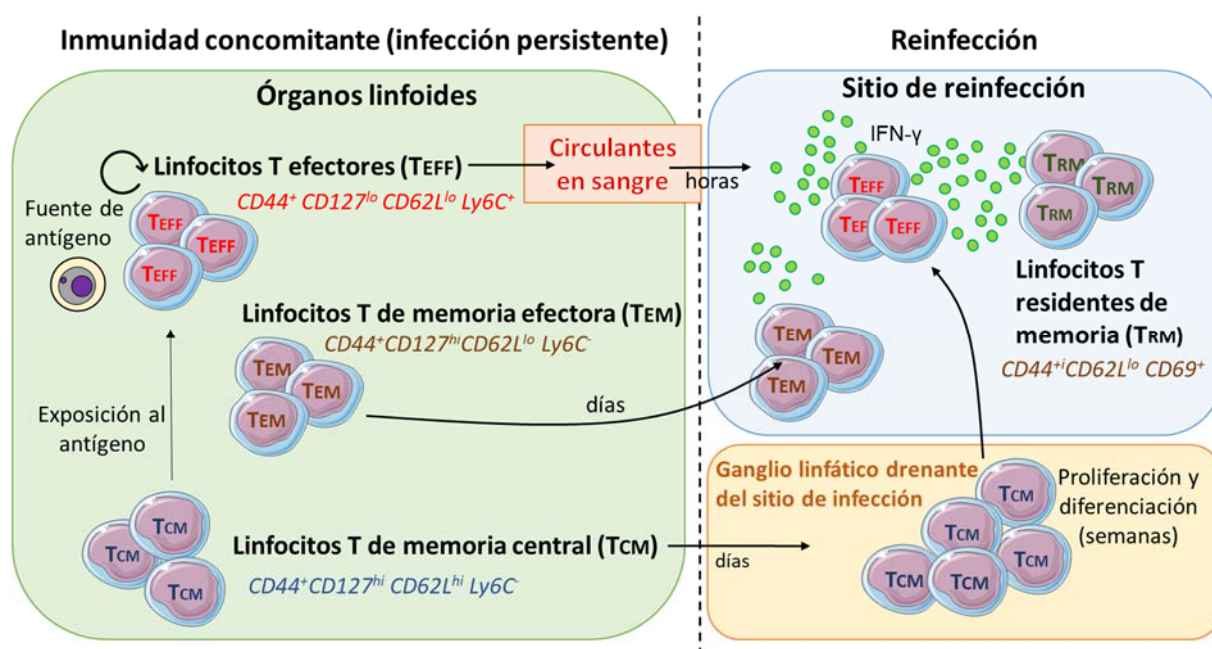
#### 1.2.4. Memoria inmunitaria

Una de las características de la respuesta inmunitaria adaptativa y la base de la vacunación es la capacidad de responder de forma más rápida y eficiente a la infección con el agente causal de una infección previa. Los ratones C57BL/6 curados de una infección con *L. major*, al igual que los humanos, son resistentes a la reinfección y son un buen modelo para estudiar el tipo de respuesta adecuada para evitar la enfermedad (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Se ha observado que tras la curación, linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectoras CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>Ly6C<sup>+</sup> (TEFF) circulantes en la sangre periférica del hospedador, son capaces de producir una respuesta rápida ante una nueva infección y conferir protección (Peters et al., 2014). Esta población sobrevive poco tiempo en ausencia de antígeno, y su mantenimiento está condicionado por la persistencia de un pequeño número de parásitos que no son eliminados tras la primera infección, debido a la respuesta reguladora, y que sirven como fuente de antígeno para activar esta respuesta efectora (Belkaid et al., 2002a). La eliminación total de los parásitos lleva consigo la pérdida de la inmunidad (Uzonna et al., 2001), así como la inoculación de parásitos muertos produce también la pérdida de protección en los ratones inmunes (Okwor et al., 2009). Sin embargo, además de este tipo de inmunidad, denominada concomitante debido a que la respuesta inmunitaria protectora coexiste con la persistencia de la infección original, se han encontrado también poblaciones de linfocitos T de memoria capaces de mantenerse en ausencia de antígeno o parásitos vivos (Okwor and Uzonna, 2008, Scott et al., 2004). Los linfocitos T de memoria se generan durante las primeras semanas de la infección con *Leishmania* junto con los linfocitos T efectoras (Colpitts and Scott, 2010) y se clasifican de forma general en linfocitos T de memoria central (TCM) y de memoria efectora (TEM) en base a la expresión de marcadores de superficie, el tejido en el que se encuentran, sus capacidades de migración y de proliferación y el tipo de función efectora (Glennie and Scott, 2016). Aunque las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria comparten muchas de las características y marcadores que las definen, se diferencian en su proceso de generación y en la función que realizan una vez reestimulados (Kaeck and Cui, 2012, Glennie and Scott, 2016). Debido a que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los mediadores principales de la respuesta inmunitaria y de la protección frente a *Leishmania*, la mayoría de estudios se han realizado sobre ellos. Cada una de estas poblaciones desempeña una función en la resistencia a la reinfección con *Leishmania* que se resume en la Figura 1.4.

Los linfocitos TCM se distinguen por una elevada expresión de los marcadores CD62L y CCR7, que les permite migrar a través de la sangre a los órganos linfoides, y mantienen una alta tasa de proliferación tras la reestimulación, pero no producen citocinas. Confieren una protección tardía comparada con la de los linfocitos TEFF, debido a que primero deben proliferar en los órganos linfoides y, en presencia de IL-12, diferenciarse a linfocitos TEFF TH1 (Zaph et al., 2004, Colpitts and Scott, 2010, Pakpour et al., 2008). En cambio, los linfocitos TEM carecen de los marcadores CD62L y CCR7, circulan por la sangre hasta los tejidos no linfoides y, tras la reestimulación, producen citocinas y adquieren

capacidades citotóxicas. Se distinguen de los linfocitos TEFF por su capacidad de persistir en ausencia de antígeno, la expresión de IL-7R (CD127) y la ausencia de Ly6C (Opata and Stephens, 2013, Peters et al., 2014, Glennie and Scott, 2016). Pueden dividirse en subpoblaciones de diferenciación temprana o tardía hacia un fenotipo efector (TEME o TEMPL) en función del marcaje con CD27 (un miembro de la familia de receptores para TNF) (Stephens and Langhorne, 2010). Además de las poblaciones TCM y TEM, los linfocitos T de memoria residentes (TRM) desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria frente a la reinfección con *L. major* (Glennie et al., 2015). Su función es la de responder inmediatamente a la reinfección sin tener que esperar la llegada de las células efectoras procedentes de otros lugares (Glennie et al., 2015, Schenkel and Masopust, 2014). Expresan en su superficie bajos niveles de CD62L y CCR7, al igual que los linfocitos TEM, pero se encuentran en lugares lejanos al sitio de la primera infección como el intestino, cerebro, pulmón, riñón y especialmente la piel, y no son capaces de migrar a otros tejidos, pero parecen persistir largo tiempo en ausencia de antígeno, producir IFN- $\gamma$  y reclutar linfocitos TEFF y monocitos inflamatorios (Glennie et al., 2017).

En ausencia de parásitos, la protección que confieren las poblaciones de linfocitos de memoria es parcial e insuficiente (Zaph et al., 2004). La única población que parece ser capaz de conferir protección por sí misma, tanto en infecciones cutáneas como viscerales, es la formada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> TEFF (Peters et al., 2014, Romano et al., 2015, Glennie and Scott, 2016).



**Figura 1.4. Inmunidad concomitante mediada por linfocitos T en la infección por *Leishmania*.** En este esquema se muestran las principales poblaciones de células de memoria y efectoras responsables de la inmunidad frente a la infección. En los individuos curados de una primera infección, se observa un número persistente de parásitos que sirven de fuente de antígeno y mantienen una respuesta efectora que es activada rápidamente en lugar de reinfección. Además, se generan poblaciones de linfocitos T de memoria que refuerzan la respuesta efectora, en general de manera más retrasada.

### 1.3. Vacunas contra la leishmaniosis

A pesar de los esfuerzos en el desarrollo e implementación de sistemas de vigilancia y eliminación de la leishmaniosis (WHO, 2010, WHO, 2015b, WHO, 2015a, WHO, 2014), cuando la prevención falla y aparecen brotes epidémicos, el control depende de tratamientos farmacológicos, que además de su coste, presentan problemas de toxicidad y no siempre son efectivos debido a la aparición de cepas resistentes (Sundar et al., 2014). En este contexto, la posibilidad de la vacunación como estrategia de prevención sería muy deseable (Bacon et al., 2013) y, dado que los pacientes recuperados de la enfermedad son inmunes a nuevas infecciones, el desarrollo de una vacuna debería ser factible y su utilidad, manifiesta (Alvar et al., 2013). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios desarrollados desde la segunda mitad del siglo XX hasta ahora y del mayor conocimiento de la biología del parásito y la inmunología de la enfermedad, todavía no existe una vacuna aprobada contra la leishmaniosis en humanos (Srivastava et al., 2016), y las que se han comercializado para la leishmaniosis canina no son capaces de prevenir con total eficacia la enfermedad ni de conferir una inmunidad duradera (Reguera et al., 2016).

Los esfuerzos se han dirigido, en su mayor parte, en inducir una inmunidad duradera mediante la vacunación a través de la activación de una respuesta celular específica (Costa et al., 2011, Kumar and Engwerda, 2014, Mutiso et al., 2013). Para ello, pueden diferenciarse dos tipos de objetivos perseguidos al diseñar una vacuna: el mantenimiento de una población de linfocitos T<sub>EFF</sub> capaces de conferir protección mediante la existencia de una fuente constante de antígeno (inmunidad concomitante), y la generación de poblaciones de linfocitos T de memoria capaces de mantener una respuesta protectora a largo plazo en ausencia de antígeno (Scott et al., 2004, Gollob et al., 2005).

#### 1.3.1. Leishmanización y vacunas de primera generación

La leishmanización con especies causantes de leishmaniosis cutánea fue la primera vacuna empleada contra la leishmaniosis y la única que se ha mostrado efectiva en humanos hasta la fecha (Lakshmi, 2013, Modabber, 1989). Consiste en la inoculación de parásitos vivos (o antiguamente exudado de lesiones activas) en partes ocultas de la piel, donde se desarrolla una lesión cutánea que cura por sí sola, pero que induce una respuesta inmunitaria capaz de proteger al individuo frente a posteriores infecciones, que de otra forma producirían lesiones, normalmente en zonas expuestas de la piel como la cara y los brazos. Se llegó a utilizar de forma generalizada en varias repúblicas de la extinta Unión Soviética, en Israel y en Irán (Khamesipour et al., 2006, Modabber, 1989, Nadim, 1997). Sin embargo, la aparición ocasional de lesiones que no curan en algunos individuos, la pandemia del VIH y la necesidad de inducir estados de inmunosupresión en algunos pacientes, junto con los problemas de distribución y estandarización de la vacuna, han ido provocando el paulatino abandono de la leishmanización (Hosseini et al., 2005). A pesar de ello, en Irán se ha utilizado como un posible

método de infección con el que evaluar la eficacia de las vacunas en ensayos de campo (Khamesipour et al., 2005). Se han dedicado esfuerzos para mejorar la seguridad de la leishmanización, como por ejemplo la adición de adyuvantes en la vacunación como oligodesoxirribonucleótidos CpG (citosa-fosfato-guanina), con el objetivo de inducir una respuesta TH1 más rápida y robusta que permita controlar más eficazmente la infección, limitando la duración y el tamaño de las lesiones cutáneas (Mendez et al., 2003, Bode et al., 2011, Wu et al., 2006).

Las vacunas de primera generación basadas en la utilización de parásitos muertos son seguras y pueden inducir, en ocasiones, respuestas TH1, pero no confieren una protección robusta (Palatnik-de-Sousa, 2008, Noazin et al., 2008) (Okwor et al., 2012). Aun así, continúan utilizándose en nuevas formulaciones de vacunas (Jafari et al., 2017), además de formar parte de la vacuna administrada en Uzbekistán para la leishmanización (Khamesipour et al., 2006).

### **1.3.2. Vacunas de segunda y tercera generación**

El abandono de la leishmanización y las limitaciones de las vacunas con parásitos muertos (Okwor et al., 2009), han llevado a desarrollar una gran actividad en lo que se conoce como segunda generación de vacunas, basadas en fracciones subcelulares del parásito o proteínas recombinantes (Singh and Sundar, 2012). Se han ensayado, como candidatos para vacuna, una gran variedad de antígenos, bien secretados por el parásito, presentes en su superficie o intracelulares, inoculados de forma individual o una mezcla de varios (Soto et al., 2009). Por ejemplo, un extracto de proteínas secretadas por el parásito constituyen la base de la vacuna para leishmaniosis canina CaniLeish® (Oliva et al., 2014). Las proteínas mayoritarias de la membrana del parásito constituyen la base de la vacuna Leishmune®, también utilizada para prevenir la leishmaniosis canina (Borja-Cabrera et al., 2004, Palatnik-de-Sousa, 2012). Por otro lado, también se han ensayado un gran número de proteínas del parásito expresadas en forma recombinante, como, por ejemplo, la proteína A2, que es la base de la vacuna Leish-Tec® comercializada para leishmaniosis canina (Fernandes et al., 2008), GP63, KMP-11 (de Mendonca et al., 2015, Basu et al., 2005), NH o SMT (Goto et al., 2009, Coler et al., 2007), algunas de las cuales han sido ya ensayadas en humanos (Coler et al., 2015, Osman et al., 2017) o forman parte de nuevas formulaciones encaminadas a ensayos clínicos en humanos (Cecilio et al., 2017). Muchas proteínas intracelulares, denominadas panantígenos por su elevada conservación evolutiva y resultar antigénicas en muchas enfermedades infecciosas y autoinmunes (Requena et al., 2000), han sido ensayadas, pues suelen suscitar respuestas inmunitarias frente a epítomos específicos de las proteínas del parásito. Este tipo de antígenos, durante la infección, suele inducir la generación de respuestas de tipo TH2, pero la utilización de adyuvantes capaces de redirigir la respuesta inmunitaria hacia el fenotipo TH1 resulta protectora (Campos-Neto, 2005). Ejemplos los encontramos en las histonas de *Leishmania* (Carrion et al., 2007), factores reguladores de la traducción (Barhoumi et al., 2011), el

antígeno LACK (Carvalho et al., 2005) y las proteínas ribosomales (Iborra et al., 2005, Ramirez et al., 2013, Ramirez et al., 2014). La proteína Q, una poliproteína formada por la combinación de antígenos de histonas y proteínas ribosomales, diseñada inicialmente para el diagnóstico serológico de leishmaniosis canina (Soto et al., 1998), mostró la capacidad de generar protección en el modelo de ratón (Parody et al., 2004) y también en el perro (Molano et al., 2003, Carcelen et al., 2009); cabe indicar que recientemente se ha comercializado con el nombre Letifend® para la leishmaniosis canina.

La utilización de vectores de expresión con las secuencias que codifican para antígenos de *Leishmania* constituye la tercera generación de vacunas. La inoculación del ADN con motivos CpG induce *per se* una respuesta TH1 que es idónea en el caso de la infección con patógenos intracelulares (Gurunathan et al., 2000). Muchas de las vacunas de segunda generación han sido probadas con mayor o menor éxito también en su forma de vacuna de ADN, previa administración o no de la proteína, como el antígeno LACK (Marques-da-Silva et al., 2005, Melby et al., 2001), las histonas (Iborra et al., 2004, Carneiro et al., 2012, Carrion et al., 2008), KMP-11 (Bhaumik et al., 2009, da Silva et al., 2011, Guha et al., 2013), proteínas ribosomales (Iborra et al., 2003), proteínas de unión al poli(A) o PABPs (Soto et al., 2015) o combinaciones de ellas (Jeibouei et al., 2017).

Existe un gran número de trabajos realizados con este tipo de vacunas, en muchos de ellos se han encontrado candidatos prometedores (Sundar and Singh, 2014), utilizando nuevos adyuvantes (Raman et al., 2012, Askarizadeh et al., 2017, Reed et al., 2013) y estrategias de vacunación, como por ejemplo la administración con microesferas de PLGA (Guha et al., 2013, Santos et al., 2013). A pesar de ello, las vacunas de segunda y tercera generación, en general, solo parecen inducir una inmunidad protectora de corta duración (Okwor and Uzonna, 2008), o no son eficaces cuando se evalúan utilizando la infección natural con flebótomos infectados (Peters et al., 2009, Peters et al., 2012). La identificación de nuevos antígenos continúa, en parte, con la ayuda de las técnicas de inmunoproteómica (Coelho et al., 2012, Abanades et al., 2012, Mou et al., 2015) y transcriptómica (Kumari et al., 2008, Kong et al., 2017), muy útiles para explorar a gran escala distintas dianas terapéuticas y vacunas.

### **1.3.3. Vacunas atenuadas**

En el contexto en que los pacientes curados de leishmaniosis cutánea o visceral quedan protegidos ante nuevas infecciones, sumado a la eficacia de la leishmanización (Noazin et al., 2008), la idea de utilizar parásitos atenuados como vacuna resulta atractiva (Silvestre et al., 2008, McCall et al., 2013). El empleo de parásitos vivos asegura inmunizar con el repertorio completo de antígenos y, además, el hecho de que los parásitos atenuados sean capaces de permanecer en el organismo, al menos por un tiempo, permite que se genere una respuesta inmunitaria completa y robusta capaz de conferir protección ante una nueva infección (Gannavaram et al., 2014).

Inicialmente, las primeras cepas atenuadas de *Leishmania* se obtuvieron mediante radiación, mutagénesis química o pérdida de virulencia por el cultivo prolongado, entre otras (Noazin et al., 2008). Sin embargo, este tipo de atenuación resulta poco controlable y plantea inconvenientes, desde el riesgo de la recuperación de la virulencia durante la infección a una atenuación excesiva que elimine la capacidad de establecer una infección subclínica suficiente para generar una respuesta inmunitaria efectiva (Selvapandiyan et al., 2012). Actualmente, la ingeniería genética permite crear líneas de patógenos con características genéticas definidas, y su utilización se ha mostrado muy exitosa en ensayos preclínicos en infecciones causadas por patógenos intracelulares tan diversos como malaria, viruela, sarampión o tuberculosis (Chhajer and Ali, 2014, Ishizuka et al., 2016, Larsen et al., 2009). Mediante manipulación genética se ha desarrollado un destacable número de cepas de *Leishmania* a las que se les ha eliminado genes concretos para el estudio de su función y también para evaluar su potencial como vacuna (Chhajer and Ali, 2014, Selvapandiyan et al., 2012, Silvestre et al., 2008).

Como se muestra en la Tabla 1.3, varios ensayos de vacunación con parásitos genéticamente atenuados han generado inmunidad protectora en modelos animales. Así, por ejemplo, la línea de *L. donovani* *Cen*<sup>-/-</sup> ha mostrado su seguridad y utilidad en ratón, hámster y perro (Selvapandiyan et al., 2009, Fiuza et al., 2015, Fiuza et al., 2016) y su capacidad de inducir respuestas inmunitarias protectoras en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas (Avishek et al., 2016). También es destacable que algunas vacunas basadas en parásitos atenuados son capaces de conferir protección frente a especies de *Leishmania* distintas a la que constituye la vacuna (protección cruzada) (Dey et al., 2014, Dey et al., 2013, Silvestre et al., 2007). Por otro lado, es interesante resaltar los ensayos realizados con vacunas vivas en las que se utilizan especies no patógenas de *Leishmania* (*L. tarentolae*), bacterias atenuadas (*Salmonella enterica*) o bacterias no patógenas (*Lactococcus lactis*) (Saljoughian et al., 2014, Dominguez-Bernal et al., 2017) modificados genéticamente para que expresen antígenos de *Leishmania* (Shahbazi et al., 2015) o de la saliva del flebótomo (Katebi et al., 2015).



Vacuna genéticamente atenuada	Modelo	Vacunación		Infección			Referencia
		Vía	Persistencia	Especie	spv	Protege	
<i>L. major dhfr-ts</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	i.v.	N/A	<i>L.major</i>	4	SÍ	(Titus et al., 1995) (Streit et al., 2001)*
		s.c.	95 spv en piel 9 spv en G.D.	<i>L.major</i> <i>L.chagasi</i> *	1 4*	NO NO*	
	CBA	i.v.	N/A	<i>L.major</i>	4	SÍ	
		s.c. i.m.					
<i>L. chagasi dhfr-ts</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	s.c.	N/A	<i>L.chagasi</i>	4	NO	(Streit et al., 2001)
		s.c.	N/A	<i>L.major</i>	4	NO	
		i.v.	≥ 4 spv en bazo, hígado	N/A	N/A	N/A	
<i>L. donovani dhfr-ts</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	s.c.	N/A	<i>L.chagasi</i>	4	NO	
<i>L. mexicana Δcpa/cpb</i>	BALB/c	s.c.	N/A	<i>L.mexicana</i>	16	SÍ	(Alexander et al., 1998)
	C57BL/6				8	SÍ	
	CBA				8	SÍ	
	Hámster	i.d.	≥ 12 spv en piel, G.D. Desarrolla patología	<i>L.mexicana</i>	12	NO	(Saravia et al., 2006)
<i>L. donovani BT1</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	i.v.	≥ 12 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	6	SÍ	(Papadopoulos et al., 2002)
<i>L. major lpg2</i> <sup>-/-</sup> Mutante compensatorio*	BALB/c	s.c.	≥ 10 spv en piel, G.D.	<i>L.major</i>	10	SÍ	(Uzonna et al., 2004b)
	SCID	s.c.	≥ 16 spv en piel, G.D.	N/A	N/A	N/A	(Spath et al., 2004)*
	C57BL/6	s.c.	≥ 10 spv en piel	<i>L.major</i>	10	NO (SÍ con CpG)	(Kebaier et al., 2006)
<i>L. mexicana ΔGDP-MP</i>	BALB/c	i.d.	≤ 5 h en piel, ganglios, bazo, hígado	N/A	N/A	N/A	(Stewart et al., 2005)
		i.p.	N/A	<i>L.mexicana</i>	3	SÍ	
		s.c.				NO	
<i>L. infantum SIR2</i> <sup>-/+</sup>	BALB/c	i.p.	≤ 8 spv en bazo, hígado, G.D.	<i>L.infantum</i>	6	SÍ	(Silvestre et al., 2007)
	SCID	i.p.	≥ 8 spv bazo, hígado	N/A	N/A	N/A	
<i>L. donovani Cen</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	i.v.	≤ 12 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	24	SÍ	(Selvapandian et al., 2009) (Dey et al., 2014)*
				<i>L.braziliensis</i>	5	SÍ	
				<i>L.major</i>	5	SÍ	
				<i>L.mexicana</i> *	30	SÍ	
	SCID	i.v.	≤ 12 spv en bazo, hígado	N/A	N/A	SÍ	
	Hámster	i.c.	≤ 10 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	5	SÍ	
<i>L. donovani Cen</i> <sup>-/-</sup> + LJM19	Hámster	i.d.	≥ 5 spv en piel y G.D. ≤ 5 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	5	SÍ	(Fiuza et al., 2016)
<i>L. donovani p27</i> <sup>-/-</sup>	BALB/c	i.v.	< 16 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	20	SÍ	(Dey et al., 2013)
				<i>L.major</i>	12	SÍ	
				<i>L.braziliensis</i>	12	SÍ	(Dey et al., 2014)*
				<i>L.mexicana</i> *	30	SÍ	
<i>L. donovani ΔALO</i>	BALB/c	i.v.	< 16 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	20	SÍ	(Anand and Madhubala, 2015)
<i>L. donovani ΔFbpase</i>	BALB/c	i.p.	< 14 spv en bazo, hígado	<i>L.donovani</i>	24	SÍ	(Saini et al., 2018)

**Tabla 1.3. Líneas de *Leishmania* genéticamente atenuadas ensayadas en modelos experimentales.** Se indica la vía de administración de la vacuna y el tiempo que persiste en los órganos analizados. A continuación, se indica la especie contra la que se ha evaluado la vacuna y el tiempo posvacunación al que se ha ensayado la duración de la inmunidad. N/A: no analizado. spv: semanas posvacunación. GD: ganglio drenante del sitio de la vacunación.

#### **1.3.4. La vacuna genéticamente atenuada de *L. infantum* $\Delta hsp70-II$**

El estudio de la organización, expresión y regulación de los genes que codifican para la proteína de choque térmico HSP70 en *Leishmania* es una línea clásica de investigación de nuestro grupo. La proteína HSP70 está codificada en *L. infantum* por dos tipos de genes, cinco copias del gen de tipo I y una única copia del gen de tipo II, cuya única diferencia es la secuencia de la región 3'UTR (Quijada et al., 1997). Todas las copias se transcriben de forma constitutiva en las condiciones normales de crecimiento de la forma promastigote, pero únicamente se traducen los mensajeros de los genes de tipo I y no los de tipo II mediante un mecanismo de regulación postranscripcional que implica a la región 3'UTR de los genes (Folgueira et al., 2005). Sin embargo, en condiciones de estrés como el choque térmico (37 °C) que sufre el parásito cuando entra en el hospedador mamífero y se transforma en la forma amastigote, se traducen también de forma eficiente los mensajeros del gen de tipo II y aumenta la cantidad disponible de la proteína HSP70 en la célula. La eliminación del gen *hsp70-II* provoca un efecto pleiotrópico, afectando a la morfología de la célula, su capacidad de replicación y especialmente a su virulencia, debido a la importancia de este gen para el amastigote (Folgueira et al., 2008).

La baja capacidad de multiplicación intracelular llevó a realizar un estudio preliminar de la capacidad profiláctica del mutante de *L. infantum*  $\Delta hsp70-II$  en ratones BALB/c (Carrion et al., 2011). La administración de estos parásitos por vía intraperitoneal, intravenosa o subcutánea resultó en una infección autolimitante, acompañada de la inducción de una respuesta específica con características TH1. Además, cuando los animales fueron infectados por vía s.c. con promastigotes virulentos de *L. major*, cuatro semanas después de haberles administrado el parásito atenuado *Li* $\Delta hsp70-II$ , desarrollaron lesiones claramente menores que los animales control y un menor número de parásitos. Además, la inoculación de esta línea mutante en modelos muy susceptibles como el hámster y los ratones inmunodeficientes SCID mostró la incapacidad de esta cepa de producir ningún signo de patología. Tampoco en los sucesivos ensayos, muchos de ellos realizados durante la presente Tesis, se ha constatado recuperación de la virulencia, demostrando así su bioseguridad.

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

La hipótesis de partida con la que se inició esta Tesis Doctoral fue que la cepa genéticamente modificada *L. infantum*  $\Delta hsp70-II$ , utilizada como vacuna atenuada, podría conferir protección duradera frente a la infección por *Leishmania*. Para el abordaje experimental, se definieron los siguientes objetivos:

1. Determinar la distribución y persistencia de los parásitos *Li* $\Delta hsp70-II$  en dos cepas de ratón (BALB/c y C57BL/6) y su posible capacidad patogénica (bioseguridad).
2. Analizar las propiedades inmunogénicas de la línea *Li* $\Delta hsp70-II$  y el efecto de la ruta de inoculación (intravenosa y subcutánea) en ratones BALB/c y C57BL/6.
3. Estudiar la capacidad profiláctica de la inoculación de *Li* $\Delta hsp70-II$  frente a la infección con *L. major* a corto y largo plazo en un modelo de susceptibilidad (BALB/c) y otro de resistencia (C57BL/6).
4. Evaluar la capacidad profiláctica a largo plazo de la administración de *Li* $\Delta hsp70-II$  frente a la infección con *L. infantum* en ratones BALB/c.
5. Determinar los parámetros inmunológicos asociados con la inducción de una respuesta protectora a la infección con *L. major* y *L. infantum* en ratón.
6. Evaluar el efecto de la administración de la línea celular *Li* $\Delta hsp70-II$  en el desarrollo de las leishmaniosis causadas por la infección con *L. amazonensis* o *L. braziliensis* en ratones BALB/c.
7. Generación de una cepa de *L. major* defectiva en el gen *hsp70-II* como alternativa vacunal.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo fueron preparados en el Laboratorio de Medios del Servicio de Cultivos del CBMSO.

#### 3.1.1. Medio M3

El medio M3 (Shields, 1977) se suplementó con 20% (v/v) de suero fetal bovino (FCS, inactivado por calor durante 30 min a 56 °C), 0,1 mg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina para preparar el medio completo (M3c).

#### 3.1.2. Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

El medio RPMI-1640 (Moore et al., 1967) fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FCS), 2 mM L-glutamina, 0,44 mM L-alanina, 0,4 mM L-asparagina, 0,343 mM L-glutamato, 0,1 mg/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina, 50 µg/ml gentamicina y 10 µM β-mercaptoetanol para obtener el medio completo (RPMIc).

#### 3.1.3. Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

El medio DMEM (Dulbecco and Freeman, 1959) se suplementó con 0,1 mg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina.

#### 3.1.4. Medio M199

El medio M199 modificado con sales Hank (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) fue suplementado con 40 mM tampón HEPES/NaOH pH 7,4 (Sigma), 100 µM adenina (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml hemina (Sigma-Aldrich), 0,0001% (p/v) biotina (Sigma-Aldrich), 0,0002 µg/ml biopterina (Sigma-Aldrich) y 10% (v/v) FCS para obtener M199 completo (M199c). Para hacer placas de medio sólido, se preparó M199c con 1% (p/v) de agar noble Difco® (BD; Nueva Jersey, EE. UU).

### 3.2. Material biológico

#### 3.2.1. Parásitos

Fueron empleadas las siguientes especies y cepas:

- *Leishmania major* V1: cepa MHOM/IL/80/Friedlin, aislada a partir de un paciente con leishmaniosis cutánea en Israel y generosamente cedida por el Dr. David Sacks (NIAID, NIH, Bethesda, EE. UU.). La cepa se cultivó en M3c en los ensayos de vacunación e infección y en M199c en los ensayos de transfección.
- *Leishmania infantum* BCN150: cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1. Generosamente cedida por el Dr. Carlos Gómez Nieto. Aislada a partir de un perro con leishmaniosis visceral en la

Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias (Departamento de Medicina y Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. Se cultivó en M3c.

- *Leishmania infantum*  $\Delta hsp70-II$ : cepa  $\Delta hsp70-II::NEO/\Delta hsp70-II::HYG$  ( $=\Delta hsp70-II$ ). Línea mutante de la cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1 creada anteriormente por la Dra. Folgueira (Folgueira et al., 2005, Folgueira et al., 2008). Los dos alelos del gen *hsp70-II* fueron sustituidos por los casetes HYG y NEO. Para su cultivo se utilizó M3c suplementado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina y 20  $\mu\text{g/ml}$  de geneticina (G418) como antibióticos de selección.
- *Leishmania infantum* BCN-LUC: cepa generosamente cedida por el Dr. Mnauel Fresno (CBMSO-UAM) y la Dra. Rosa Reguera (Universidad de León). Es una línea obtenida a partir de la cepa MCAN/ES/96/BCN/150 que porta el gen *luc* y el casete de resistencia PURO. Se cultivó en M3c suplementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de puromicina.
- *Leishmania infantum* JPC: cepa MCAN/ES/98/LLM-722, aislada de un perro con leishmaniosis canina en Madrid y generosamente cedida por el Dr. Javier Moreno del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España). Se cultivó en M199c.
- *Leishmania amazonensis*: cepa IFLA/BR/67/PH8 aislada de un flebotomino infectado en Brasil y generosamente cedida por el Dr. Javier Moreno del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España). Se cultivó en M3c.
- *Leishmania braziliensis*: cepa MHOM/BR/01/BA788 aislada de un paciente de leishmaniosis cutánea en Brasil y generosamente cedida por el Dr. Manoel Barral-Neto y la Dra. Camila Indiani de Oliveira (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. Salvador, Bahia, Brasil). Se cultivó en M3c.

Todos los parásitos pasaron por ratón para mantener su infectividad y se cultivaron a 26 °C en botellas de cultivo celular Falcon® (Corning, Nueva York, EE. UU.). Los antibióticos de selección fueron suministrados por InvivoGen (California; EE. UU.).

### 3.2.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de entre 6 y 8 semanas de edad de las cepas BALB/c y C57BL/6. Los animales fueron suministrados por Envigo (Barcelona, España) y mantenidos en las instalaciones del animalario del CBMSO, o adquiridos y mantenidos en el animalario del Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ (Salvador, Bahía, Brasil). Los procedimientos descritos a continuación sobre inoculación, toma de muestras y eutanasia se realizaron en el animalario del CBMSO o del Instituto Gonçalo Moniz y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CBMSO (CEEA-CBMSO 21/138), el Comité de Bioética del CSIC (100/2014) y el Gobierno de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 121/14).

Los animales se inocularon por vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola utilizando una aguja de 25G y una luz roja para calentar y dilatar la vena. La inoculación subcutánea (s.c.) se realizó en la almohadilla plantar con una aguja de 30G. La inoculación intraperitoneal (i.p.) se realizó en el abdomen con una aguja de 25G. La inoculación intradérmica (i.d.) se realizó en la oreja utilizando una aguja de 30G y con ayuda de una lupa de disección. El sangrado se realizó mediante la punción en la vena facial con una aguja de 23G o mediante la vía intracardiaca (i.c.) con una aguja de 25G cuando la extracción fue *post mortem*. Cuando fue necesario, los animales se anestesiaron con 2% de isoflurano Forane® (AbbVie Farmacéutica, Madrid, España) y un flujo de O<sub>2</sub> de 1,8 ml/min. La eutanasia se realizó mediante la liberación paulatina de CO<sub>2</sub> en una cámara para tal fin.

### 3.3. Ensayos de vacunación e infección en ratón

#### 3.3.1. Vacunación e infección de los animales

Para la vacunación e infección de los animales, los parásitos se centrifugaron a 1370 x *g*, se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS; NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,42 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, pH 7,4) y se resuspendieron en el volumen de PBS adecuado para cada ensayo.

Los ratones fueron vacunados con 1 x 10<sup>7</sup> promastigotes de *L. infantum* Δ*hsp70-II* por vía i.v. (BALB/c) o s.c. (BALB/c y C57BL/6). La inoculación i.v. se realizó en 200 μl en la vena lateral de la cola, mientras que la inoculación s.c. se realizó en la almohadilla plantar de la pata derecha en un volumen de 30 μl.

La infección con *L. major* se realizó en ratones BALB/c por vía s.c. en la almohadilla plantar de la pata izquierda con 5 x 10<sup>4</sup> promastigotes de *L. major* V1 en estado estacionario. En los ratones C57BL/6 la infección se realizó en la oreja por vía intradérmica (i.d.) con 1 x 10<sup>3</sup> promastigotes metacíclicos en un volumen de 10 μl.

La infección con *L. infantum* se realizó por vía i.v. en la vena lateral de la cola de los ratones BALB/c. Se inocularon 1 x 10<sup>8</sup> promastigotes en estado estacionario de *L. infantum* BCN-LUC o 1 x 10<sup>6</sup> promastigotes de la cepa JPC en un volumen de 200 μl de PBS.

La infección con *L. amazonensis* se realizó por vía s.c. en la almohadilla plantar de la pata izquierda de ratones BALB/c. Se inocularon 5 x 10<sup>4</sup> promastigotes en estado estacionario en 30 μl de PBS.

La infección con *L. braziliensis* se realizó por vía i.d. en la oreja de ratones BALB/c. Se inocularon 1 x 10<sup>5</sup> promastigotes en estado estacionario en un volumen de 10 μl de PBS.



### **3.3.2. Aislamiento de promastigotes metacíclicos de *L. major***

Se siguió la metodología descrita por el Dr. Sacks con algunas modificaciones (Sacks et al., 1985). Se tomaron aproximadamente  $1 \times 10^8$  promastigotes en fase estacionaria, se lavaron con medio DMEM y se centrifugaron a  $1370 \times g$  durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 2 ml de DMEM y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con aglutinina de cacahuete (PNA) (Vector Laboratories, California, EE. UU.) a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Durante ese tiempo se forma el aglutinado de promastigotes no metacíclicos con la lectina. Posteriormente, se añadieron 10 ml de medio con cuidado de no deshacer el agregado y se centrifugaron los parásitos a  $55 \times g$  durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante, donde se encuentran las formas metacíclicas, y se centrifugó a  $1370 \times g$  durante 5 min. El sedimento con los parásitos metacíclicos se lavó finalmente con PBS y se prepararon a la concentración adecuada para la infección.

### **3.3.3. Seguimiento de la infección**

La hinchazón de la almohadilla plantar, provocada por la infección con *L. major* y *L. amazonensis* en los ratones BALB/c, se determinó semanalmente mediante un calibre digital y los datos presentados corresponden a la diferencia entre la medida transversal de la almohadilla infectada y la no infectada. El diámetro de las lesiones cutáneas en la oreja de los ratones C57BL/6 infectados con *L. major* y el grosor de la zona infectada en la oreja de los ratones BALB/c infectados con *L. braziliensis* se midió semanalmente también utilizando un calibre digital.

La distribución y diseminación de los parásitos de la cepa de *L. infantum* BCN150-LUC en los ratones BALB/c fue evaluada semanalmente mediante el sistema de imagen *in vivo* IVIS® Spectrum (PerkinElmer, Massachussets, EE.UU.). Los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 4,5 mg del sustrato bioluminiscente luciferina (PerkinElmer) en un volumen de 300  $\mu\text{l}$ . Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software Living Image® (PerkinElmer) para determinar el estado de la infección.

### **3.3.4. Obtención de muestras biológicas de ratón**

#### **3.3.4.1. Obtención del suero**

La sangre de los animales se obtuvo como se ha descrito arriba y se incubó durante 30 min a 37 °C. A continuación, se incubó durante 16 h a 4 °C y finalmente se microfugó durante 15 min para obtener el suero, el cual se almacenó a -20 °C en glicerol (1:1) hasta el momento de su uso.

#### **3.3.4.2. Obtención de cultivos primarios de células de ratón**

Una vez realizada la eutanasia en la cámara de CO<sub>2</sub>, se realizó la disección de los animales y se extrajo en condiciones asépticas alguna o varias de las siguientes muestras: el bazo, los ganglios

(poplíteos, inguinales, mesentéricos, axilares y/o submaxilares), una porción del hígado, el fémur, la almohadilla plantar y la oreja. Se determinó, cuando fue necesario, el peso de las muestras.

El bazo, la porción de hígado, los ganglios y la almohadilla plantar se homogenizaron en una suspensión celular con RPMI mediante el uso de un tamiz comercial de 70  $\mu$ M Falcon® Cell Strainer (Corning; Nueva York, EE. UU.). Las células del bazo y el hígado se lavaron con RPMI, se centrifugaron a 490 x g durante 5 min y se resuspendieron en 2 ml de un tampón hipotónico para la lisis de los eritrocitos (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, CO<sub>3</sub>HK, 1mM EDTA, pH 7,4) en el que se incubaron durante 2 min en un baño a 37 °C. A continuación, las células del bazo, hígado, ganglio y almohadilla plantar se lavaron con RPMI y se centrifugaron a 490 x g durante 5 min. El sedimento del ganglio y el bazo se resuspendió en 1 y 2 ml de RPMIc, respectivamente, para realizar los ensayos de estimulación y citometría de flujo, y se determinó el número de células mediante el conteo en una cámara de Neubauer. El sedimento de la almohadilla plantar y del hígado se resuspendió en 1 y 2 ml de M3c, respectivamente, para los ensayos de determinación de carga parasitaria por dilución límite.

Para obtener las células de la médula ósea se cortaron las epífisis del fémur y se perfundió el hueso con PBS. La suspensión celular se lavó con M3, se centrifugó a 490 x g durante 5 min y se resuspendió en 1 ml de medio M3c.

Las orejas de los animales se esterilizaron con etanol y posteriormente se separaron de forma aséptica las caras ventral y dorsal. Cada una de ellas se incubó durante 2 h en 1 ml de DMEM con 50  $\mu$ g/ml de Liberase™ CI Roche (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) en placas de cultivo celular de 48 pocillos Nunclon™ (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU) a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se disgregó el tejido y se preparó una suspensión celular en RPMI utilizando un tamiz comercial Cell Strainer de 70  $\mu$ M (Falcon®). Las células se centrifugaron a 490 x g durante 5 min y se resuspendieron en 1 ml de RPMIc para los ensayos de estimulación y citometría de flujo o 1 ml de M3c para la determinación de la carga parasitaria mediante dilución límite.

### 3.3.5. Estimación de la carga parasitaria

La determinación del número de parásitos vivos presentes en cada muestra analizada se realizó mediante el método de la dilución límite (Buffet et al., 1995) adaptado a las necesidades del experimento. Se realizaron por triplicado o cuádruplicado diluciones seriadas 1/3 de las suspensiones celulares de cada tejido (o diluciones de las mismas) en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano Falcon® (Corning; Nueva York, EE. UU.) en un volumen final de 150  $\mu$ l de medio M3c por pocillo. Para la determinación del número de parásitos *LiΔhsp70-II* se añadieron al medio 50  $\mu$ g/ml de higromicina y 20  $\mu$ g/ml de G418. Las placas se incubaron a 26 °C durante 10 días y se determinó la presencia de promastigotes recién diferenciados en los distintos pocillos.

El número de parásitos en cada muestra ( $P$ ) se calculó con la siguiente fórmula:  $P = 3^n \times \text{factor de dilución}$ , siendo  $n$  el último pocillo en que se observó al menos un promastigote. El resultado final se expresó como el logaritmo en base 10 de la media geométrica del número de parásitos calculado en cada réplica de la muestra. El valor de carga parasitaria está referido al órgano completo en el caso del bazo, ganglio y almohadilla plantar, por g de tejido en el caso del hígado, y por  $1 \times 10^7$  células de médula ósea. El límite de detección de la técnica, según las condiciones experimentales expuestas en el apartado 3.3.4.2., es de unos de 20 parásitos por muestra.

### **3.3.6. Preparación del antígeno soluble de *Leishmania* (SLA)**

EL SLA se obtuvo a partir de un cultivo de promastigotes de la especie correspondiente en fase estacionaria. El cultivo se centrifugó a  $1370 \times g$  durante 5 min y se lavó 3 veces con PBS. Los parásitos se resuspendieron en 1 ml de PBS y se sometieron a 3 ciclos de congelación rápida en nieve carbónica y descongelación a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación, la muestra se sometió a 3 ciclos de 10 s de sonicación en un equipo Labsonic® M (Sartorius AG, Gotinga, Alemania) utilizando el 100% de su amplitud. A continuación, el lisado se microfugó durante 15 min y se determinó en el sobrenadante la concentración del extracto de proteínas solubles del parásito mediante el reactivo Quick Start™ Bradford (Bio-Rad; California, EE. UU.), utilizando BSA como estándar de referencia. El SLA se almacenó en alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **3.3.7. Diferenciación de células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón (BMDDCs) y su preparación como células presentadoras de antígenos**

La médula ósea de ratón se obtuvo a partir del fémur y la tibia como se ha descrito arriba. La suspensión celular de médula ósea se resuspendió en 25 ml de medio de diferenciación: RPMI suplementado con 10 % FCS, 10 mM HEPES, 0,1 mg/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicina y 20 ng/ml del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; PeproTech, Londres, Reino Unido). Las células se incubaron durante 6 días en botellas de  $175\text{ cm}^2$  Nunclon™ (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.) a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Tras las primeras 72 h de cultivo se añadieron 25 ml de medio de diferenciación hasta un volumen final de 50 ml.

A continuación, las células diferenciadas no adherentes se recogieron para utilizarlas como presentadoras de antígeno. Se prepararon a  $8 \times 10^5$  células/ml en el medio de diferenciación y parte de las mismas se estimuló con antígenos de la especie de *Leishmania* correspondiente. En algunos experimentos la estimulación se realizó añadiendo 12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SLA al cultivo y en otros mediante la infección de las BMDDCs con promastigotes de *Leishmania* en una relación 5:1 parásito:célula. Las células se incubaron durante 16-24 h a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de 5%  $\text{CO}_2$  en placas de cultivo celular

Nunclon (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.). Antes de utilizarlas como presentadoras de antígeno se lavaron 3 veces con RPMIc.

### **3.3.8. Condiciones de cultivo *in vitro* para determinar la concentración de citocinas en el sobrenadante**

#### **3.3.8.1. Estimulación con SLA**

Las suspensiones celulares de bazo y ganglio se prepararon en RPMIc a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml en placas de cultivo celular Nunclon (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.) en presencia de 12 µg/ml de SLA de la especie correspondiente o 1 µg/ml de concanavalina A (Merck; Darmstadt, Alemania) como control positivo de estimulación, o en ausencia de estímulo. Las células se cultivaron durante 72 h a 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub> y a continuación el sobrenadante celular fue alicuoteado y almacenado a -70 °C.

#### **3.3.8.2. Estimulación con células presentadoras de antígenos (BMDDCs)**

Los esplenocitos se prepararon en RPMIc y se sembraron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml junto con BMDDCs presentadoras de antígenos de *Leishmania* (ver 3.3.7) a una concentración final  $4 \times 10^5$  células/ml. La estimulación se realizó durante 48 h a 37 °C en presencia de 5% CO<sub>2</sub> en placas de cultivo celular Nunclon (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.). El sobrenadante del cultivo se almacenó alicuoteado a -70 °C.

### **3.3.9. Condiciones de estimulación para analizar la expresión de citocinas en linfocitos T por citometría de flujo**

#### **3.3.9.1. Estimulación con anti-CD3/anti-CD28**

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano High Bind COSTAR® (Corning; Nueva York, EE. UU.) que se tapizaron con 10 µg/ml del anticuerpo anti-CD3ε (Clon 145-2C11) en PBS durante 2 h a 37 °C y se almacenaron a 4 °C durante 16-24 h. Los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS y se sembraron  $1 \times 10^6$  células de la suspensión en 100 µl de RPMIc. Se añadieron 2 µg/ml del anticuerpo anti-CD28 (Clon 37.51) y las placas se incubaron durante 6 h a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Los anticuerpos específicos de ratón fueron suministrados por eBioscience™ (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.). En las últimas 4-6 h de estimulación se añadieron 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) para detener la secreción de citocinas al medio.

#### **3.3.9.2. Estimulación con células presentadoras de antígeno (BMDDCs)**

Los esplenocitos se prepararon en RPMI a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml junto con BMDDCs presentadoras de antígenos de *Leishmania* (ver 3.3.7) a una concentración final de  $4 \times 10^5$  células/ml. La estimulación se realizó en placas de cultivo celular Nunclon (Thermo Fisher;

Massachusetts, EE. UU.) durante 16-24 h a 37 °C en presencia de 5% CO<sub>2</sub>. Durante las últimas 4-6 h se añadieron 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) para detener la secreción de citocinas al medio.

### 3.3.10. Tinciones para citometría de flujo

La tinción para citometría se realizó en placas de 96 pocillos con fondo V Falcon® (Corning; Nueva York, EE. UU.), utilizando 1 x 10<sup>6</sup> células por punto de análisis. Después de ser centrifugadas en la placa a 750 x g durante 2 min y lavadas con 150 µl del tampón FACS (PBS + 1% FCS), las células se incubaron a 4 °C durante 5 min con 50 µl de Mouse BD FcBlock™ (Clon 2.4G2) (BDBiosciences, California, EE. UU.) diluido 1:100 en tampón FACS. A continuación, se añadieron 50 µl de la mezcla de los anticuerpos de superficie que forman el panel de tinción preparada en tampón FACS (ver ANEXO I). Las células se incubaron durante 20 min a 4 °C en oscuridad y después se centrifugaron y lavaron 2 veces en tampón FACS. En los experimentos que incluyeron únicamente el marcaje de moléculas de superficie, las células se fijaron durante 15 min a 4 °C en oscuridad con una solución de formalina 10% (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania) y finalmente se lavaron con el tampón FACS.

En aquellos experimentos en los que, además del marcaje de superficie, se analizó la producción de citocinas, las células se fijaron y permeabilizaron con 100 µl de la solución Cytofix/Cytoperm™ (BDBiosciences, California, EE. UU.) durante 20 min a 4 °C en oscuridad. A continuación, se lavaron dos veces con 150 µl del tampón PermWash™ (BD) y se preparó la mezcla de anticuerpos anti-citocinas en el mismo tampón. La tinción intracelular se realizó en oscuridad en un volumen de 50 µl a 4 °C durante 30 min. Las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con PermWash™ y, finalmente, se resuspendieron en 200 µl del tampón FACS.

El análisis de la tinción se realizó en el citómetro BD FACSCanto™II mediante el software de adquisición y análisis BD FACSDiva™ 8.0 (BDBiosciences, California, EE. UU.). Los resultados fueron procesados y representados utilizando el software FlowJo® 10 (FlowJo LLC, Oregon, EE. UU.). La estrategia de análisis y los controles utilizados se describen en el ANEXO I.

Los anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados con fluoróforos utilizados para el análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo se resumen en la tabla 3.1.

MARCAJE	ANTICUERPO	CLON	DILUCIÓN	REFERENCIA
Superficie	CD3ε APC	500A2	1/200	BIOLEGEND 152306
Superficie	CD4 BV570™	RM4-5	1/200	BIOLEGEND 100542
Superficie	CD8a FITC	53-6.7	1/200	BIOLEGEND 100706
Superficie	CD44 APC/Fire™ 750	IM7	1/200	BIOLEGEND 103061
Superficie	CD62L BV421™	MEL-14	1/200	BIOLEGEND 104436
Superficie	CD127 PerCP/Cy5.5	A7R34	1/200	BIOLEGEND 135021
Superficie	CD27 PE	LG.3A10	1/200	BIOLEGEND 124210
Superficie	MHC-II FITC	39-10-8	1/200	BIOLEGEND 115006
Superficie	Ly6C PerCP/Cy5.5	HK1.4	1/200	BIOLEGEND 128012
Superficie	Ly6G Pacific Blue™	1A8	1/200	BIOLEGEND 127612
Superficie	CD11c APC/Cy7	N418	1/200	BIOLEGEND 117324
Superficie	CD11b PE/Cy7	M1/70	1/200	BIOLEGEND 101216
Intracelular	IFN-γ PE	XMG1.2	1/100	BD 554412
Intracelular	IFN-γ PE/Cy7	XMG1.2	1/100	BIOLEGEND 505825
Intracelular	IL-10 BV421	JES5-16E3	1/100	BIOLEGEND 505022

**Tabla 3.1. Anticuerpos monoclonales utilizados para el análisis por citometría de flujo.**

### 3.3.11. Determinación del título de anticuerpos anti-SLA

La reactividad del suero frente al extracto soluble de proteínas de *Leishmania* (SLA) se valoró mediante ELISA. Se utilizaron para los ensayos placas de 96 pocillos MaxiSorp Nunc (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.) antigenadas con 2 µg/ml de SLA en PBS durante 16 h a 4 °C. Se lavaron los pocillos 3 veces con una solución de lavado compuesta por Tween 20 (Merck; Darmstadt, Alemania) al 0,5% en PBS durante 5 min y se incubaron durante 2 h con una solución de bloqueo compuesta por solución de lavado con leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana, Asturias) al 5% PBS. Los lavados e incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en un agitador de placas PSU-2T (Biosan; Riga, Letonia). A continuación, se añadió el suero de los animales en solución de bloqueo a una dilución adecuada (entre 1:50 y 1:200, normalmente) y se realizaron diluciones seriadas 1/2. Se incubaron los sueros durante 2 h a temperatura ambiente y después los pocillos se lavaron 3 veces. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se emplearon distintos anticuerpos secundarios específicos de diferentes isotipos de ratón, diluidos en solución de bloqueo: anti-IgG (1:1000), anti-IgG1 (1:1000), anti-IgG2a (1:2000) y anti-IgG2c (1:2000). Todos los anticuerpos secundarios fueron suministrados por Nordic BioSite (Täby, Suecia).

Para el revelado, se lavaron los pocillos tres veces y se incubaron en oscuridad con orto-fenilendiamina (OPD) como sustrato para la peroxidasa siguiendo las indicaciones del fabricante

(Agilent-Dako; California, EE. UU.). La reacción colorimétrica se detuvo con la adición de 1/2 volumen de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. La absorbancia se midió a 490 nm en espectrofotómetro de placas Model 680 (Bio-Rad; California, EE. UU.). El valor del título de un suero corresponde al valor inverso de la última dilución que mostró una reactividad  $> 0,15$  unidades de absorbancia.

### **3.3.12. Determinación de la concentración de citocinas mediante ELISA**

La cuantificación de la concentración de citocinas en el sobrenadante de las células del bazo y el ganglio de los animales se llevó a cabo mediante kits comerciales basados en la técnica Sandwich-ELISA para la detección de IFN- $\gamma$  e IL-10 (Diacclone; Besançon, Francia), IL-4 y TNF (eBioscience-Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.). Se emplearon placas de ELISA de alta afinidad COSTAR® (Corning; Nueva York, EE. UU.) para realizar los ensayos y un agitador PSU-2T (Biosan, Riga, Letonia) para realizar las incubaciones y lavados a temperatura ambiente. De forma general, pues la metodología difiere ligeramente según el fabricante, las placas se tapizaron con el anticuerpo anti-citocina durante 16 h a 4 °C. A continuación, los pocillos se lavaron 4 veces con una solución de Tween 20 (Merck; Darmstadt, Alemania) al 0,05% en PBS durante 5 min en agitación y se bloquearon durante 2 h con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en PBS o con la solución comercial. Se añadió a los pocillos los sobrenadantes del cultivo celular en una dilución adecuada (entre 1/2 y 1/5) en el tampón de dilución (PBS + 1% BSA o la solución comercial proporcionada en el kit). En los pocillos destinados para ello, se incluyó una recta patrón con distintas concentraciones de la citocina según las indicaciones del fabricante. Los sobrenadantes se incubaron 3 h en presencia del anticuerpo de detección anti IFN- $\gamma$  e IL-10 y posteriormente los pocillos se lavaron 3 veces. Para la detección de IL-4 y TNF los sobrenadantes se incubaron 2 h y los pocillos se lavaron 3 veces antes de añadir los anticuerpos de detección e incubar posteriormente las placas 1 h. Después de los lavados del anticuerpo de detección biotinilado, se añadió estreptavidina-HRP o avidina-HRP, según el fabricante, se incubaron las placas durante 30 min y se lavaron 4 veces. Para el revelado, se añadió la solución sustrato de la peroxidasa TMB y se incubaron las placas en oscuridad durante 15 min. La reacción se detuvo añadiendo 1/2 volumen de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y la absorbancia a 450 nm se midió en un espectrofotómetro de placas Model 680 (Bio-Rad; California, EE. UU.). La concentración de cada citocina en el sobrenadante se calculó utilizando los valores de absorbancia obtenidos en la recta patrón de cantidades conocidas de citocina.

### **3.3.13. Medida de la concentración de nitritos por el método de Griess**

Se evaluó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) mediante la medida de la concentración de nitrito en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Para ello, en placas de 96 pocillos MaxiSorp Nunc (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.), se mezcló en proporción 1:1 el reactivo Griess (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania), preparado en agua a 40 mg/ml, con el sobrenadante del cultivo celular o una recta patrón con distintas concentraciones de  $\text{NO}_2\text{Na}$ . La

reacción se incubó durante 15 min en oscuridad y después se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de nitrito en los sobrenadantes se calculó utilizando los valores de la recta patrón.

### **3.4. Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software; California, EE. UU.). Los datos fueron sometidos a un test de normalidad de D' Agostino-Pearson cuando el tamaño del grupo fue de al menos 7 animales. Cuando los datos superaron el test de normalidad se aplicó un análisis estadístico paramétrico: prueba *t* de Student desapareada de dos colas para la comparación entre dos grupos y ANOVA seguido del test post-hoc de Tukey para comparar entre más de dos grupos. Cuando los datos no superaron el test de normalidad o el tamaño de la muestra fue menor de 7 animales, se aplicó un análisis estadístico no paramétrico: Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos y Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para la comparación múltiple. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0,05$ .

La representación gráfica de los resultados se realizó en la mayoría de ocasiones en un gráfico de dispersión o un diagrama de barras y bigotes (Klaus, 2016).





## RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Capacidad de inducir inmunidad protectora de la línea *LiΔhsp70-II* en ratones BALB/c y C57BL/6

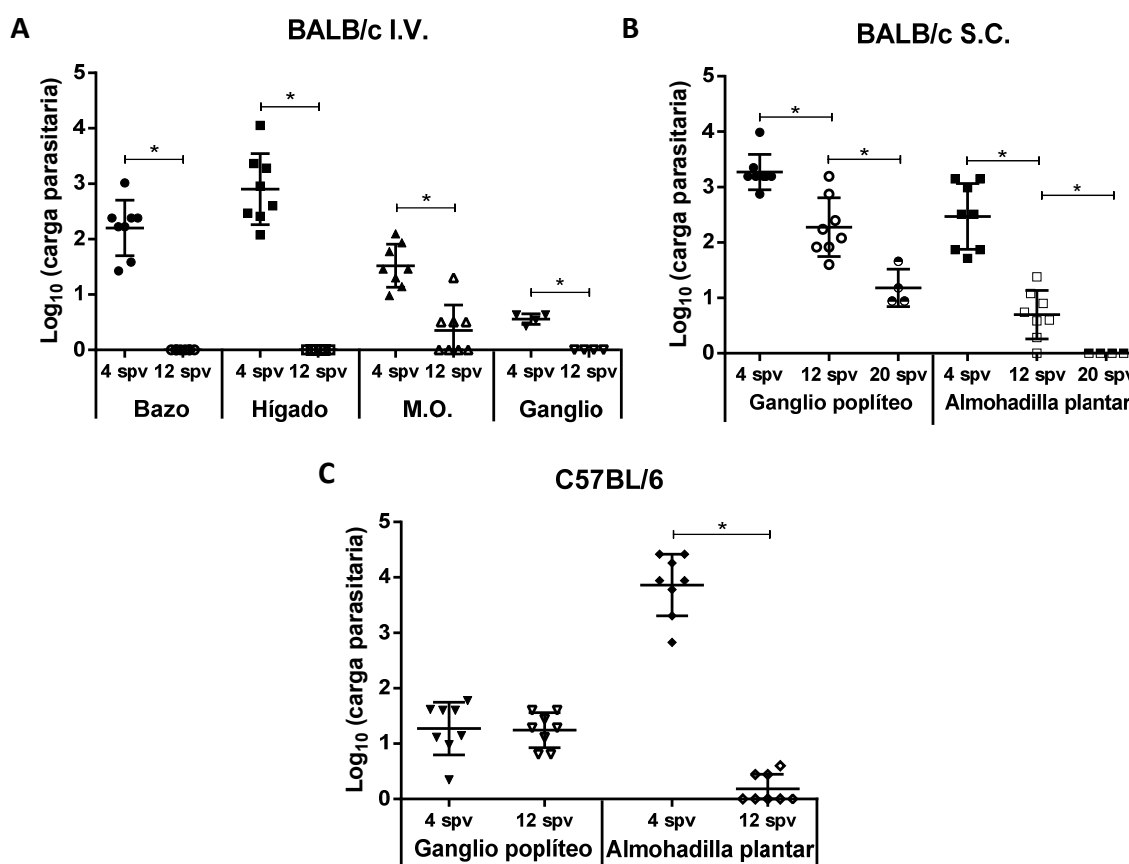
Anteriormente, en un estudio preliminar del grupo, se puso de manifiesto que la inoculación i.v. de promastigotes de la cepa atenuada de *L. infantum LiΔhsp70-II* protege frente a una infección subsiguiente (4 semanas posvacunación) con *L. major* (Carrion et al., 2011). Con estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó analizar de una forma más profunda y sistemática la capacidad inmunoprotectora de esta cepa atenuada. Así, se pensó en estudiar la duración de la inmunidad generada, el efecto de la vía de inoculación y la utilización de dos cepas de ratón, BALB/c y C57BL/6, que muestran una susceptibilidad muy diferente a la infección con *L. major*.

#### 4.1.1. Evolución de la carga parasitaria en ratones vacunados con *LiΔhsp70-II*

La inoculación i.v. de  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* en ratones BALB/c produjo la diseminación de los parásitos por los órganos internos, encontrándose a las 4 semanas en el bazo, el hígado, la médula ósea y los ganglios linfáticos (Figura 4.1A). Sin embargo, la carga parasitaria disminuyó hasta no encontrar parásitos vivos 12 semanas después en el bazo, el hígado o los ganglios. Tampoco se encontraron parásitos en la médula ósea de la mitad de los animales a las 12 semanas posvacunación y en la otra mitad el número de parásitos detectados fue significativamente menor que a las 4 semanas.

Cuando la inoculación se realizó por vía s.c. en la almohadilla plantar de ratones BALB/c, los parásitos permanecieron confinados en el ganglio poplíteo drenante del sitio de infección y no se detectaron en órganos internos. El número de parásitos en el ganglio disminuyó entre las 4 y 20 semanas tras la inoculación, pero no se encontraron animales que no tuvieran parásitos (Figura 4.1B). En la almohadilla plantar su número disminuyó significativamente a partir de la semana 4, y después de 20 semanas no fueron detectados en el sitio de infección (Figura 4.1B).

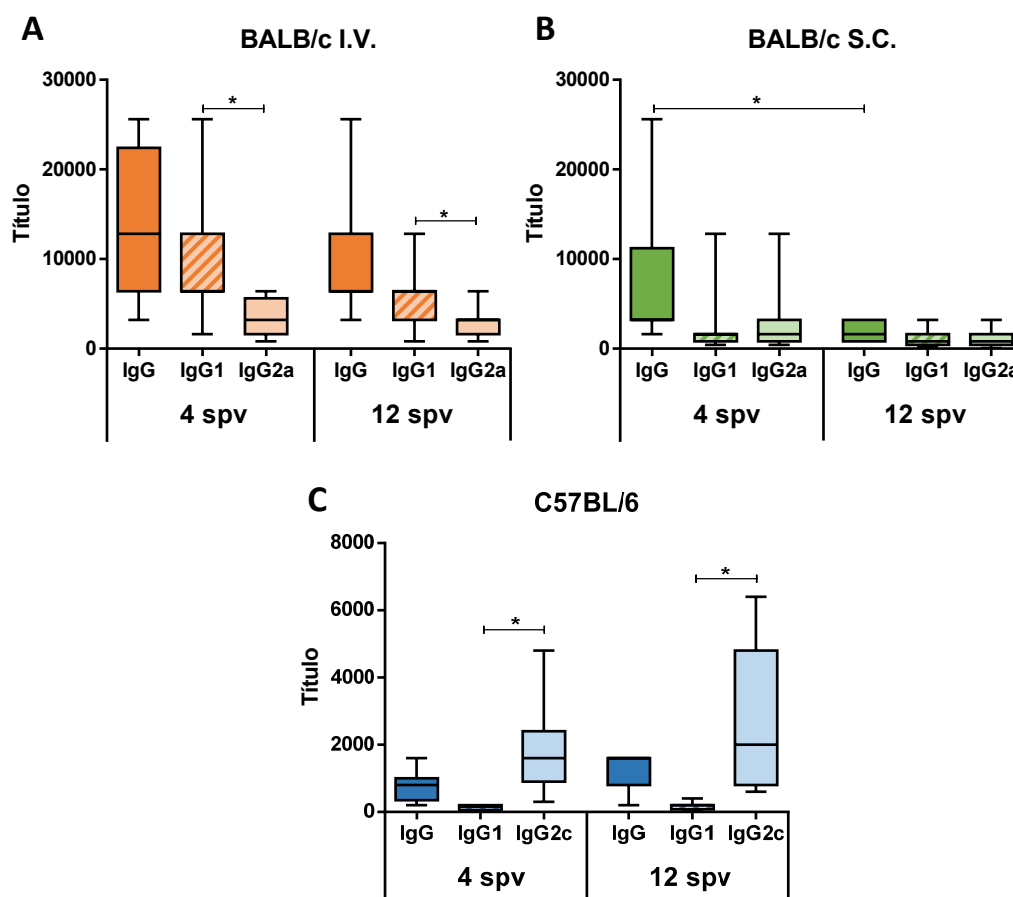
En los ratones C57BL/6 inoculados por vía s.c. ocurrió algo similar, aunque el número de parásitos detectados en todos los casos fue menor que los presentes en el modelo BALB/c, sobre todo en el ganglio. Sin embargo, en el ganglio poplíteo se observó que el número de parásitos persistentes se mantuvo muy similar a las semanas 4 y 12, y en magnitud equivalente al que se ha descrito como suficiente para mantener la resistencia a la reinfección (Belkaid et al., 2002a). En la almohadilla plantar, la carga parasitaria disminuyó entre la semana 4 y 12, en la que ya no se encontraron parásitos en la mayoría de los animales (Figura 4.1C).



**Figura 4.1. Evolución de la carga parasitaria en ratones vacunados con *LiΔhsp70-II*.** Ratones BALB/c (A, B) y C57BL/6 (C) (8 animales por grupo) fueron inoculados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔHSP70-II* por vía intravenosa (i.v.) (A) o subcutánea (s.c.) en la almohadilla plantar (B, C). Se analizó el número de parásitos mediante dilución límite 4 semanas (4 spv), 12 semanas (12 spv) o 20 semanas (20 spv) posvacunación. En (A) se muestra el número de parásitos en el bazo, hígado, médula ósea del fémur (M.O.) y el conjunto de ganglios linfáticos poplíteos, inguinales, axilares y submaxilares. En (B) y (C) se muestra la carga parasitaria en el ganglio poplíteo drenante al sitio de inoculación s.c. y la almohadilla plantar como lugar de la inoculación. Se indican las diferencias estadísticamente significativas según la prueba *t* de Student entre los grupos señalados con \* ( $P < 0,05$ ). Se muestra un resultado representativo de al menos dos experimentos independientes.

#### 4.1.2. Respuesta humoral en los animales vacunados con *LiΔhsp70-II*

En paralelo, se analizaron algunos de los parámetros de la respuesta inmunitaria generada tras la inoculación de los parásitos atenuados por las diferentes vías. Primero, se analizó en el suero de ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* la presencia de anticuerpos específicos de *Leishmania* mediante ELISA. La inoculación por vía i.v. en ratones BALB/c indujo una respuesta humoral IgG mixta, aunque con un predominio del subtipo IgG1 frente al IgG2a (Figura 4.2A). En los ratones inoculados por vía s.c. la respuesta fue también mixta, aunque de menor magnitud, especialmente cuando se analizó a las 12 semanas (Figura 4.2B). En el modelo C57BL/6, la respuesta humoral fue más baja que en BALB/c y además polarizada hacia el subtipo IgG2c en los dos tiempos analizados (Figura 4.2C).



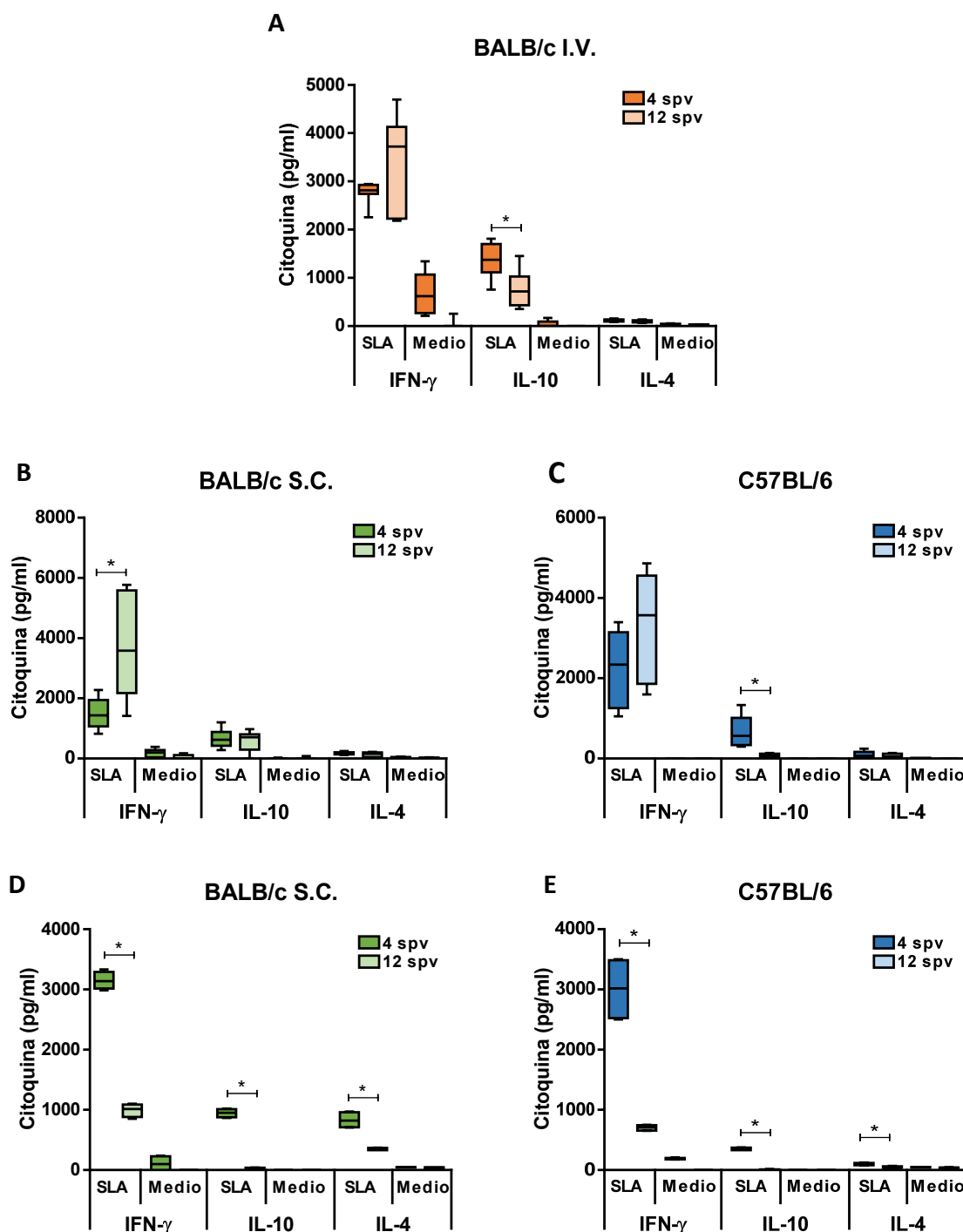
**Figura 4.2. Respuesta humoral inducida tras la inoculación de *LiΔhsp70-II*.** Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos IgG y los subtipos IgG1 e IgG2a específicos de SLA en el suero de ratones BALB/c (A, B), o IgG1 e IgG2c en C57BL/6 (C) 4 o 12 semanas posvacunación (spv) con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía i.v. (A) o vía s.c. (B, C). También se incluyó en cada ensayo suero de animales inoculados con PBS, que no dieron reactividad (no mostrado). Se representa un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del título de anticuerpos y se indican las diferencias estadísticamente significativas según el test de Mann-Whitney entre los grupos seleccionados mediante \* ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.3. Respuesta celular en animales vacunados con *LiΔhsp70-II*

El tipo de respuesta celular que se desarrolla en un animal infectado con *Leishmania* es clave en la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad y el desarrollo de la patología. Se analizó mediante ELISA la producción de distintas citocinas en cultivos de esplenocitos y células del ganglio poplíteo de los animales vacunados tras la estimulación durante 72 h con SLA.

Los resultados indicaron que la vacunación con *LiΔhsp70-II* induce una respuesta celular de tipo Th1 cuando se estimula con antígenos del parásito. Tanto en ratones BALB/c vacunados por vía i.v. (Figura 4.3A) como ratones BALB/c y C57BL/6 vacunados por vía s.c. (Figura 4.3B y 4.3C, respectivamente) se observó una producción predominante de IFN- $\gamma$  específica de antígeno, aunque también se detectó cierta cantidad de IL-10 e IL-4. Es destacable que la producción de IFN- $\gamma$  se mantuvo o incluso fue mayor en los esplenocitos de ratones sacrificados 12 semanas posvacunación (grupo de inmunidad a largo plazo), mientras que la producción de IL-10 disminuyó, con respecto a lo detectado

en los ratones analizados 4 semanas posvacunación (grupo de inmunidad a corto plazo). También resulta interesante destacar que la ruta s.c., que produce sólo una infección local, induce en el bazo una respuesta inmunitaria equivalente a la que se produce tras la inoculación i.v. El análisis en el ganglio poplíteo drenante de la infección s.c. en ratones BALB/c (Figura 4.3D) y C57BL/6 (Figura 4.3E), indica que se produce una fuerte respuesta mediada por IFN- $\gamma$  durante las primeras semanas, pero que disminuye significativamente a las 12 semanas posvacunación.



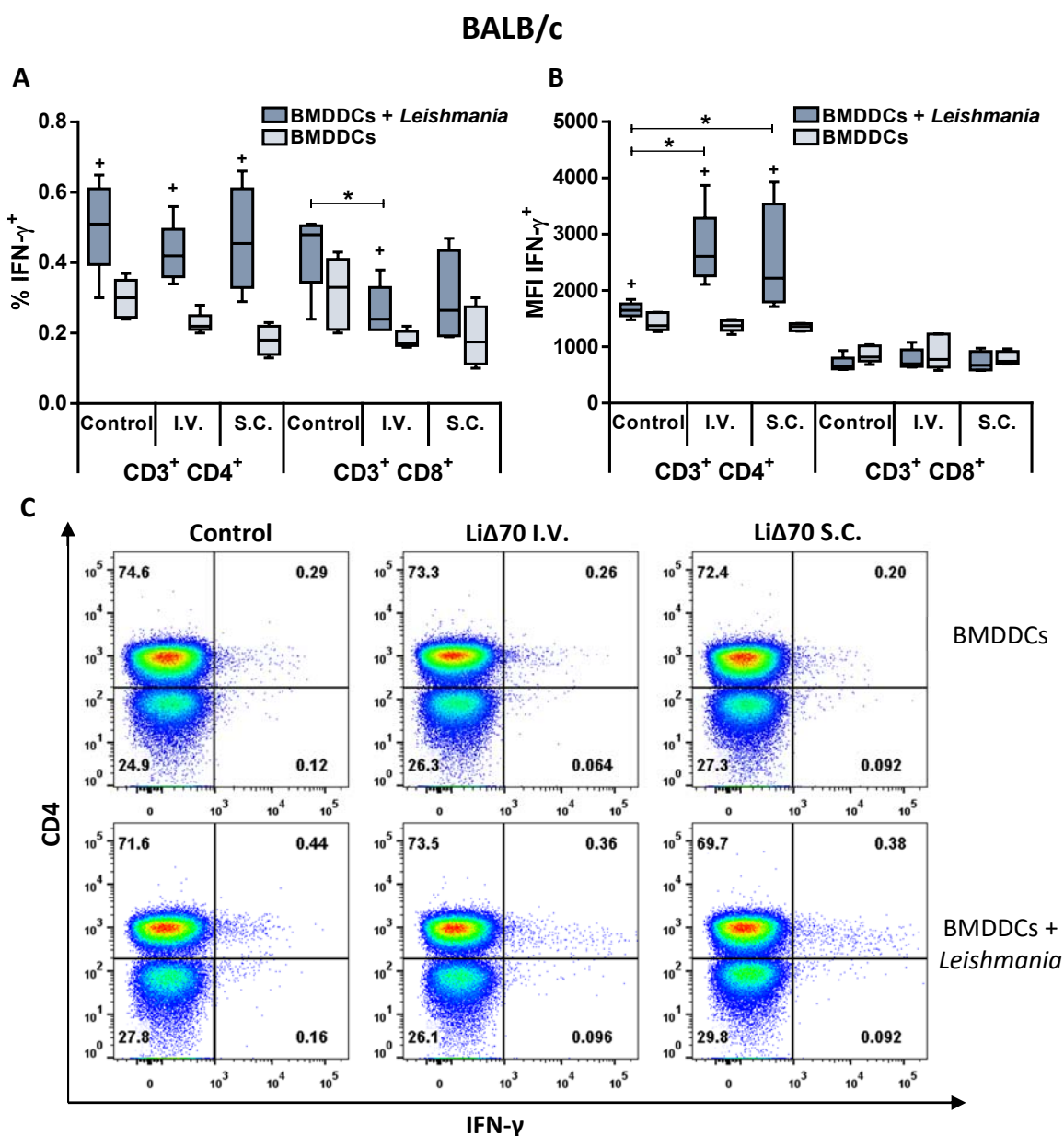
**Figura 4.3. Respuesta celular inducida en animales inoculados con la línea *LiΔhsp70-II*.** Se analizó mediante ELISA la producción de citocinas tras la estimulación con SLA de esplenocitos de ratones (8 animales por grupo) BALB/c vacunados por vía i.v. (A) o por vía s.c. (B), y en ratones C57BL/6 (C) sacrificados 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) posvacunación. En (D) y (E) se muestra la producción específica de citocinas, estimulada por SLA, en el ganglio poplíteo de los ratones BALB/c y C57BL/6 inoculados por vía s.c., respectivamente. En los experimentos también se incluyeron muestras de ratones control (inoculados con PBS) en los que no se detectaron citocinas (no mostrado). Se muestra un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico de la concentración de cada citocina. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados a corto y largo plazo tras la vacunación se determinaron según el test de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0,05$ ). Los resultados mostrados son representativos de, al menos, dos ensayos independientes.

#### 4.1.4. Caracterización de los linfocitos T implicados en la respuesta celular

Se estudió también el fenotipo de los linfocitos T responsables de la respuesta TH1 inducida por la inoculación de *LiΔhsp70-II*. Para estimular la proliferación de las poblaciones de linfocitos específicos, esplenocitos obtenidos de ratones vacunados 12 semanas antes, se incubaron durante 16-24 h con células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDDCs), previamente incubadas o no con promastigotes de *L. infantum*. Posteriormente, se realizó el marcaje de las células con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-IFN- $\gamma$  para su análisis por citometría de flujo.

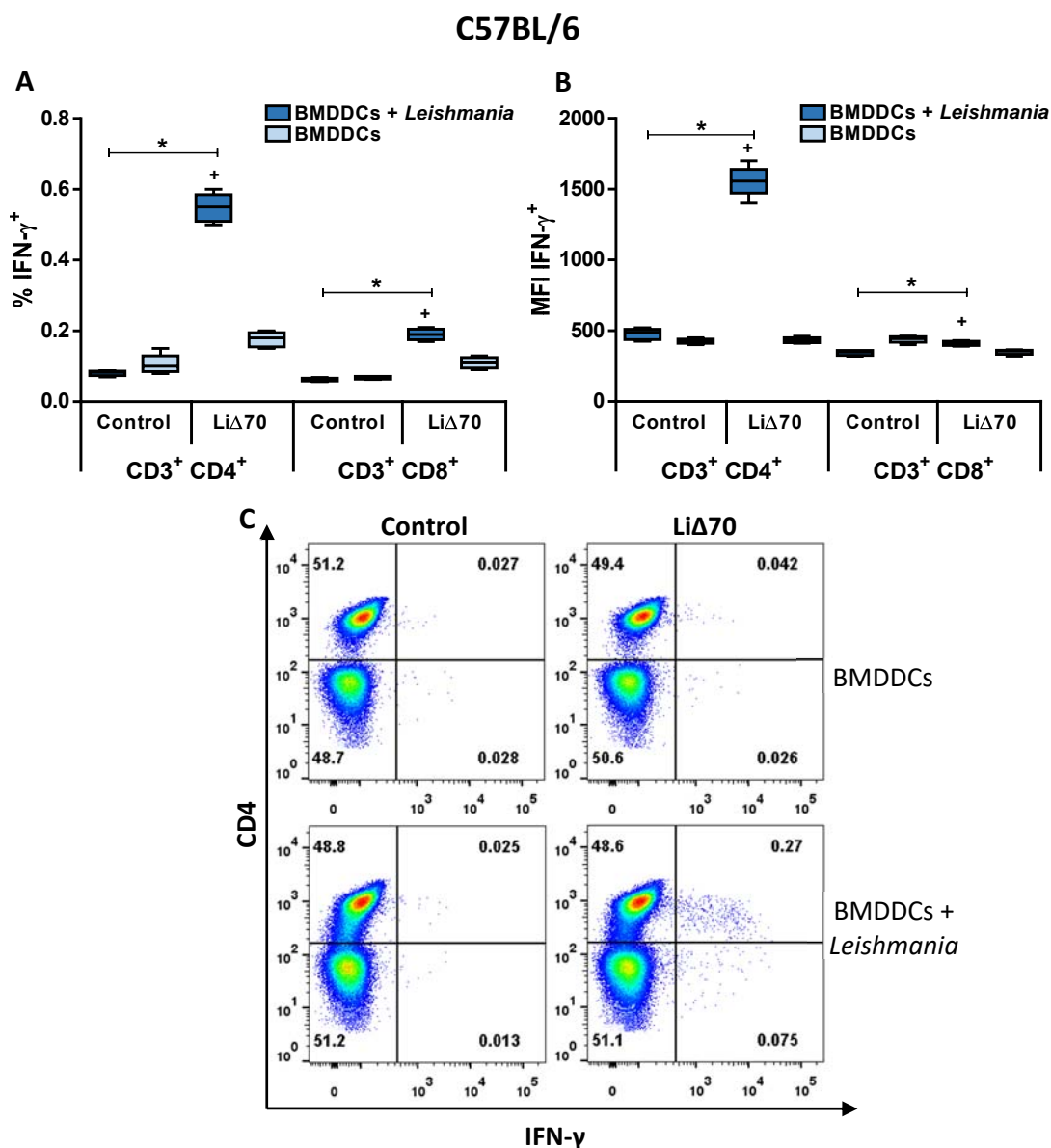
En la Figura 4.4 se muestran los resultados del análisis de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c inoculados con *LiΔhsp70-II*. Se observó un pequeño aumento de la población IFN- $\gamma^+$  en los linfocitos CD3 $^+$  CD4 $^+$  en respuesta a la presentación de antígenos de *Leishmania*, y también en los linfocitos CD3 $^+$  CD8 $^+$ , aunque de menor magnitud (Figura 4.4A). Cabe destacar que, aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  con respecto al grupo control (Figura 4.4A), sí que lo fue la mediana de la intensidad de la fluorescencia (MFI) en la población de linfocitos CD3 $^+$  CD4 $^+$  procedentes de los animales vacunados, pero no la de linfocitos CD3 $^+$  CD8 $^+$  (Figura 4.4B). Esto sugiere que la respuesta no se debe a un incremento del número de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ , sino más bien a un aumento en los niveles de producción de la citocina en las células IFN- $\gamma^+$  tras la estimulación.





**Figura 4.4. Poblaciones de linfocitos T productores de IFN-γ en ratones BALB/c vacunados.** Esplenocitos de ratones BALB/c (5 animales por grupo) vacunados 12 semanas antes (LiΔ70) o inoculados con PBS (Control) se estimularon con células dendríticas derivadas de médula de ratón (BMDDCs) previamente infectadas con *L. infantum* o sin infectar como condición control. Se analizaron las poblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> productores de IFN-γ por citometría de flujo tras 16 h de estimulación. En (A) y (B) se muestra la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de la población IFN-γ<sup>+</sup> y su mediana de intensidad de fluorescencia (MFI), respectivamente, en las células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. En (C) se muestra un panel representativo de las células CD3<sup>+</sup> distribuidas por su expresión de CD4 e IFN-γ. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con la prueba de Mann-Whitney entre las células estimuladas con BMDDCs infectadas con *Leishmania* y aquellas estimuladas con BMDDCs no infectadas se muestran mediante + ( $P < 0,05$ ), mientras que \* ( $P < 0,05$ ) hace alusión a las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados.

En el bazo de los ratones C57BL/6, también se determinó que los linfocitos  $CD3^+ CD4^+$  son los responsables de la producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con células dendríticas presentadoras de antígenos de *Leishmania*, mientras que los linfocitos  $CD3^+ CD8^+$  tienen un papel minoritario en su producción (Figura 4.5A). En este caso, se observó un aumento tanto del número de linfocitos T  $CD4^+$  productores de IFN- $\gamma$  (Figura 4.5A) como de la cantidad de IFN- $\gamma$  producido (Figura 4.5B).



**Figura 4.5. Poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/6 vacunados.** Esplenocitos de ratones C57BL/6 (5 animales por grupo) vacunados 12 semanas antes (Li $\Delta$ 70) o inoculados con PBS (Control) se estimularon con células dendríticas derivadas de médula de ratón (BMDDCs) previamente infectadas con *L. infantum* o sin infectar como condición control. Se analizaron las poblaciones de linfocitos  $CD3^+ CD4^+$  y  $CD3^+ CD8^+$  productores de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo tras 16 h de estimulación. En (A) y (B) se muestra la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de la población IFN- $\gamma^+$  y su mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) en las células  $CD3^+ CD4^+$  y  $CD3^+ CD8^+$ , respectivamente. En (C) se muestra un panel representativo de las células  $CD3^+$  distribuidas por su expresión de CD4 e IFN- $\gamma$ . Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con la prueba de Mann-Whitney entre las células estimuladas con BMDDCs infectadas con *Leishmania* y aquellas estimuladas con BMDDCs no infectadas se muestran mediante + ( $P < 0,05$ ), mientras que \* ( $P < 0,05$ ) hace alusión a las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados.

## **4.2. Evaluación de la capacidad protectora de la vacuna *LiΔhsp70-II* frente a la infección con *L. major***

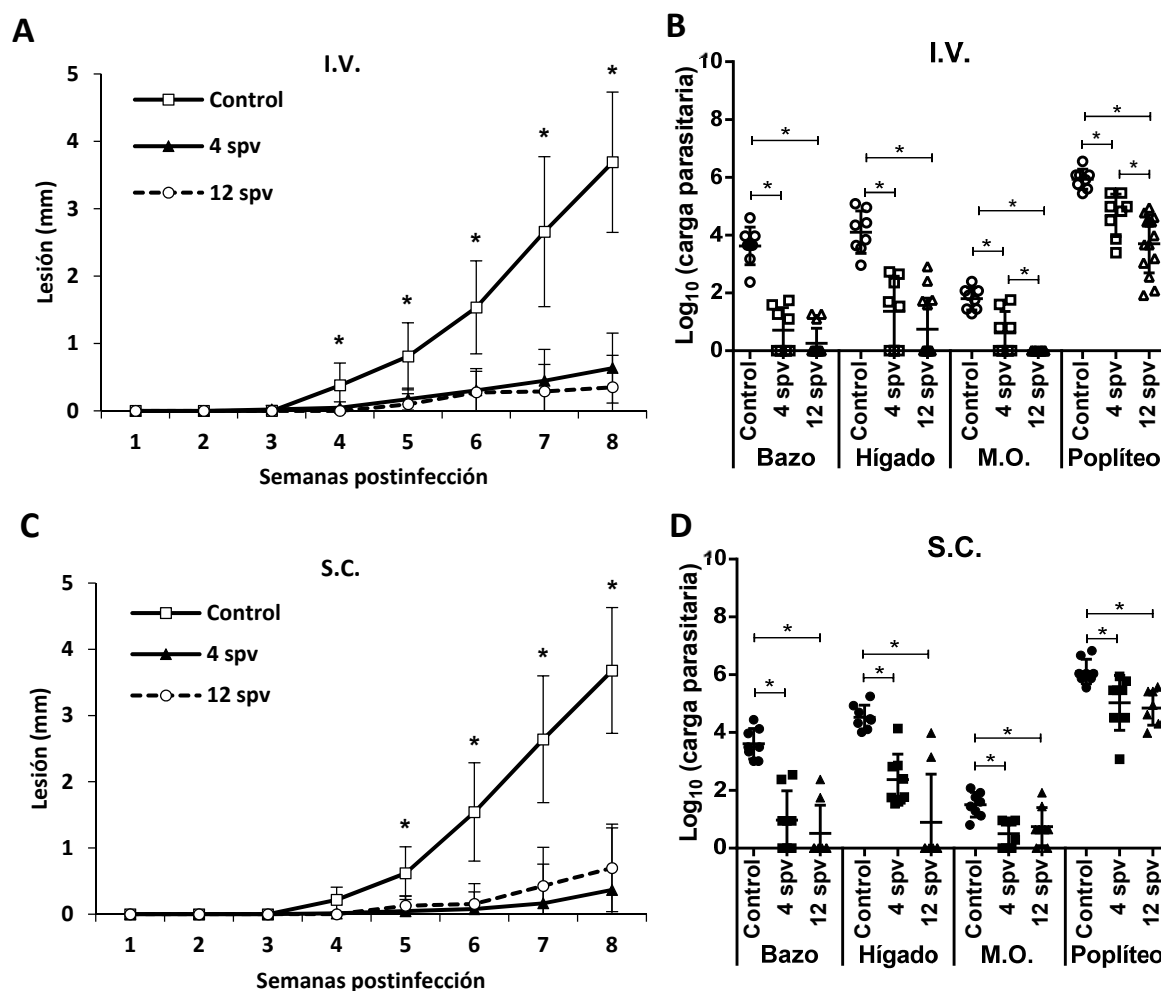
Una vez determinado el tipo de respuesta inmunitaria específica inducida por la vacunación con la línea atenuada *LiΔhsp70-II*, se decidió analizar la capacidad profiláctica de la vacuna, tanto a corto como a largo plazo, frente a la infección con *L. major* en el modelo de leishmaniosis cutánea con ratones susceptibles BALB/c y resistentes C57BL/6.

### **4.2.1. La vacunación por vía i.v. o s.c. con *LiΔhsp70-II* genera una protección duradera contra la infección por *L. major***

Ratones BALB/c, vacunados 4 o 12 semanas antes por vía i.v. o s.c., fueron infectados con  $5 \times 10^4$  promastigotes en fase estacionaria de *L. major* en la almohadilla plantar contralateral a la vacunada. Se realizó un seguimiento semanal de la aparición de lesiones, midiendo la tumefacción en la pata infectada (Figura 4.6).

Los ratones control comenzaron a desarrollar una lesión a partir de la semana 4 postinfección, que fue aumentando progresivamente en tamaño hasta que en la semana 8 tuvieron que ser sacrificados por la aparición de necrosis. Sin embargo, la vacunación i.v. no solo corroboró la protección previamente observada a corto plazo (Carrion et al., 2011), sino que además demostró que la capacidad profiláctica se mantiene a largo plazo. En ambos grupos de vacunación, la hinchazón fue mínima y más retrasada en el tiempo (Figura 4.6A). La disminución del tamaño de la lesión se correlacionó también con un descenso en el número de parásitos con respecto a los existentes en los ratones control (Figura 4.6B). En el bazo y el hígado se observó una reducción significativa (100 veces menor) de la carga parasitaria, encontrando incluso animales sin parásitos en dichos órganos. En la médula ósea y el ganglio poplíteo de la pata infectada con *L. major* se encontraron entre 10 y 100 veces menos parásitos en los animales vacunados que en los ratones control. También cabe destacar que, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre las lesiones de los ratones vacunados 4 o 12 semanas antes de la infección, se observó una reducción significativa del número de parásitos en el ganglio poplíteo del grupo de 12 semanas con respecto al grupo de 4 semanas. Este efecto también se observó la médula ósea, donde no se encontraron parásitos en el grupo infectado 12 semanas después de la vacunación (Figura 4.6B).

Los resultados de protección utilizando una vía de vacunación poco agresiva como la s.c., la cual genera una infección local y una respuesta inmunitaria sistémica, indican que los animales vacunados de esta forma adquieren protección a corto y largo plazo frente a la infección con *L. major* (Figura 4.6C y 4.6D). Al igual que ocurre con la vía i.v., la protección se asoció a un menor desarrollo de lesiones (Figura 4.6C) y al control en el número de parásitos en el bazo, hígado, médula ósea y ganglio poplíteo (Figura 4.6D).

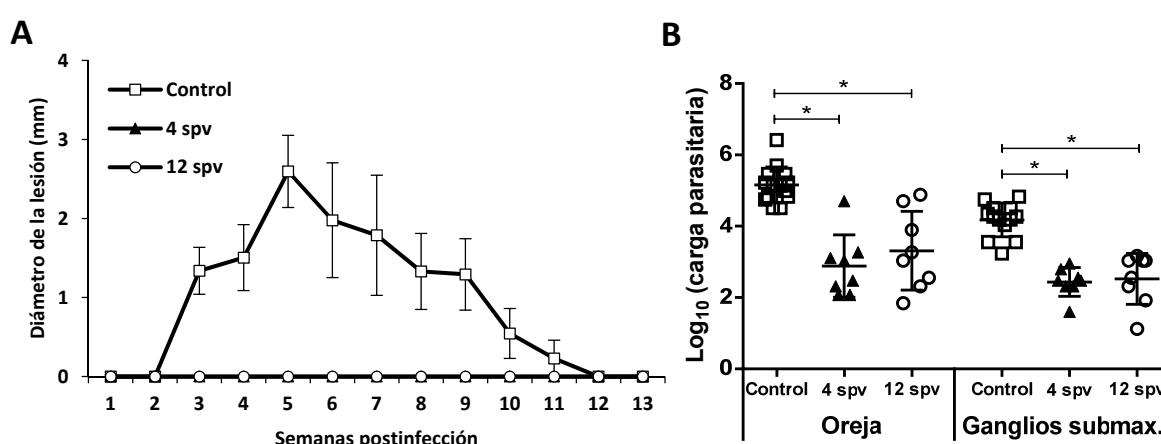


**Figura 4.6. La vacunación con *LiΔhsp70-II* confiere protección duradera en ratones BALB/c infectados con *L. major*.** Ratones BALB/c (8 animales por grupo), vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía i.v. (A, B) o s.c. (C, D) o inoculados con PBS (Control), fueron infectados con  $5 \times 10^4$  promastigotes de *L. major* en la almohadilla plantar 4 o 12 semanas después de la vacunación (4 spv o 12 spv). El tamaño de la lesión se midió semanalmente por la tumefacción de la almohadilla de la pata infectada. Se representa la media y la desviación estándar de las lesiones en los grupos vacunados por vía i.v. (A) o vía s.c. (C) y las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos vacunados analizadas con la prueba *t* de Student (\* $P < 0,01$ ). Los animales fueron sacrificados 8 semanas tras la infección con *L. major* y se determinó la carga parasitaria mediante dilución límite. El gráfico muestra el número de parásitos de cada animal en el bazo, el hígado, la médula ósea (M.O.) y el ganglio poplíteo de la pata infectada, en el ensayo de vacunación i.v. (B) o s.c. (D). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados determinadas mediante ANOVA y el método *post-hoc* de Tukey se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de un ensayo que se repitió al menos dos veces.

Para estudiar la capacidad profiláctica de la vacuna en el modelo C57BL/6, ratones vacunados y controles se infectaron en la oreja 4 o 12 semanas después con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* por vía intradérmica (i.d.). El grupo de ratones control desarrolló lesiones inflamatorias en el sitio de infección que fueron disminuyendo progresivamente a medida que los animales curaban, de acuerdo con lo esperado en el fenotipo de resistencia frente a la infección por *L. major* que muestra

este tipo de ratón (Belkaid et al., 2000). En cambio, los ratones vacunados no mostraron lesión en ningún momento tras la infección con *L. major* (Figura 4.7A).

El análisis de la carga parasitaria se realizó 5 semanas después de la infección, cuando la lesión inflamatoria en los ratones control alcanzó su máximo tamaño y antes de que empezara a curar (Figura 4.7B). El número de parásitos en la oreja y los ganglios submaxilares, drenantes del sitio de la infección con *L. major*, fue alrededor de 100 veces menor en los ratones vacunados con respecto a los controles, y no se encontraron diferencias en el número de parásitos entre los dos grupos de vacunación (4 o 12 semanas). En el bazo y el hígado de los animales infectados (vacunados y controles) no se encontraron parásitos.



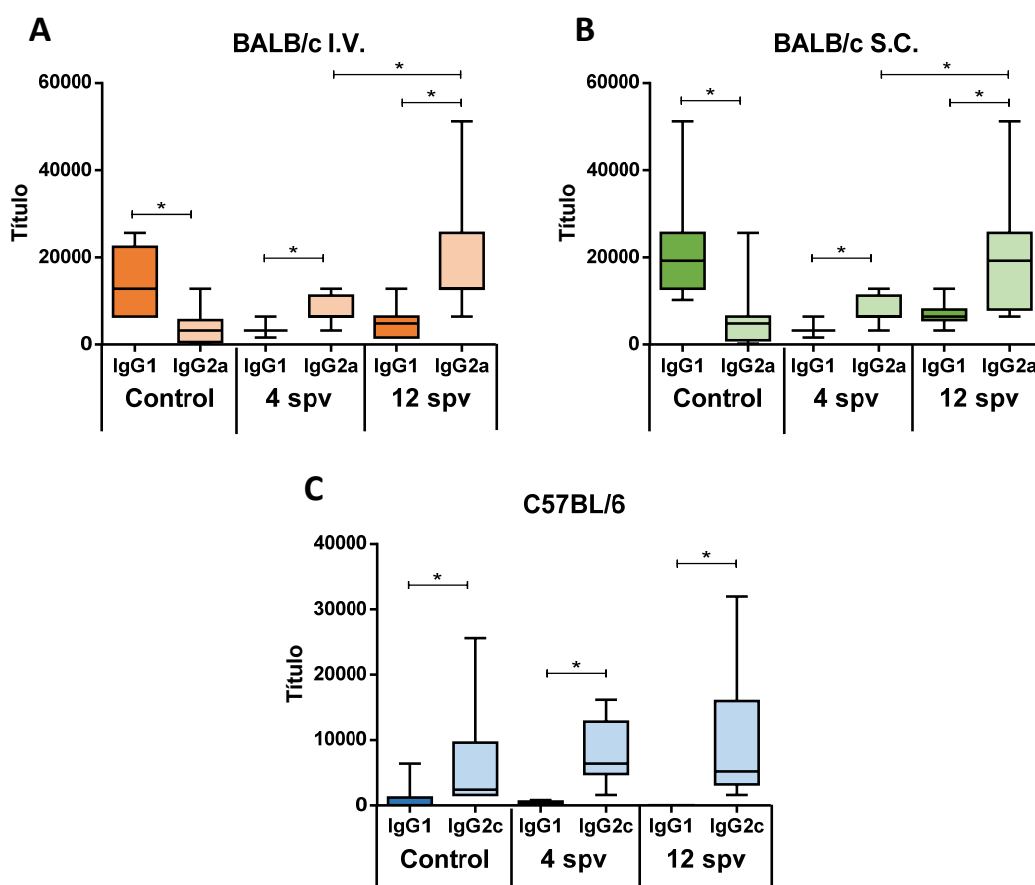
**Figura 4.7. Evolución de la infección con *L. major* en ratones C57BL/6.** Animales vacunados (8 animales por grupo) con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control) por vía s.c. se infectaron 4 o 12 semanas después de la vacunación con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la dermis de la oreja. El diámetro de la lesión inflamatoria en el sitio de infección se midió semanalmente. En la gráfica se representa la media y la desviación estándar de las medidas (A). En la semana 5 postinfección se sacrificaron los animales para analizar la carga parasitaria por dilución límite en la oreja infectada y el ganglio submaxilar drenante del sitio de la infección (B). En el gráfico se muestra el número de parásitos de cada animal, además de la media y la desviación estándar del grupo. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante ANOVA y la prueba *post-hoc* de Tukey, y se indican con \* ( $P < 0,0001$ ). Este estudio se repitió completo al menos dos veces, con resultados equivalentes.

#### 4.2.2. Respuesta inmunitaria postinfección

Como se ha mostrado en la sección anterior, la vacunación con *LiΔhsp70-II* protege de las manifestaciones clínicas de la infección con *L. major* al tiempo que promueve una importante reducción de la carga parasitaria. Para analizar la respuesta inmunitaria asociada con esta protección, primero se determinó la presencia de anticuerpos anti-SLA y la producción de citocinas por linfocitos estimulados con SLA en los animales infectados.

En los ratones BALB/c vacunados se encontró una polarización en el título de anticuerpos hacia el subtipo IgG2a, mientras que en los animales control se detectaron principalmente anticuerpos IgG1 anti-SLA (Figura 4.8A y 4.8B para los grupos i.v. y s.c, respectivamente). La magnitud de la respuesta

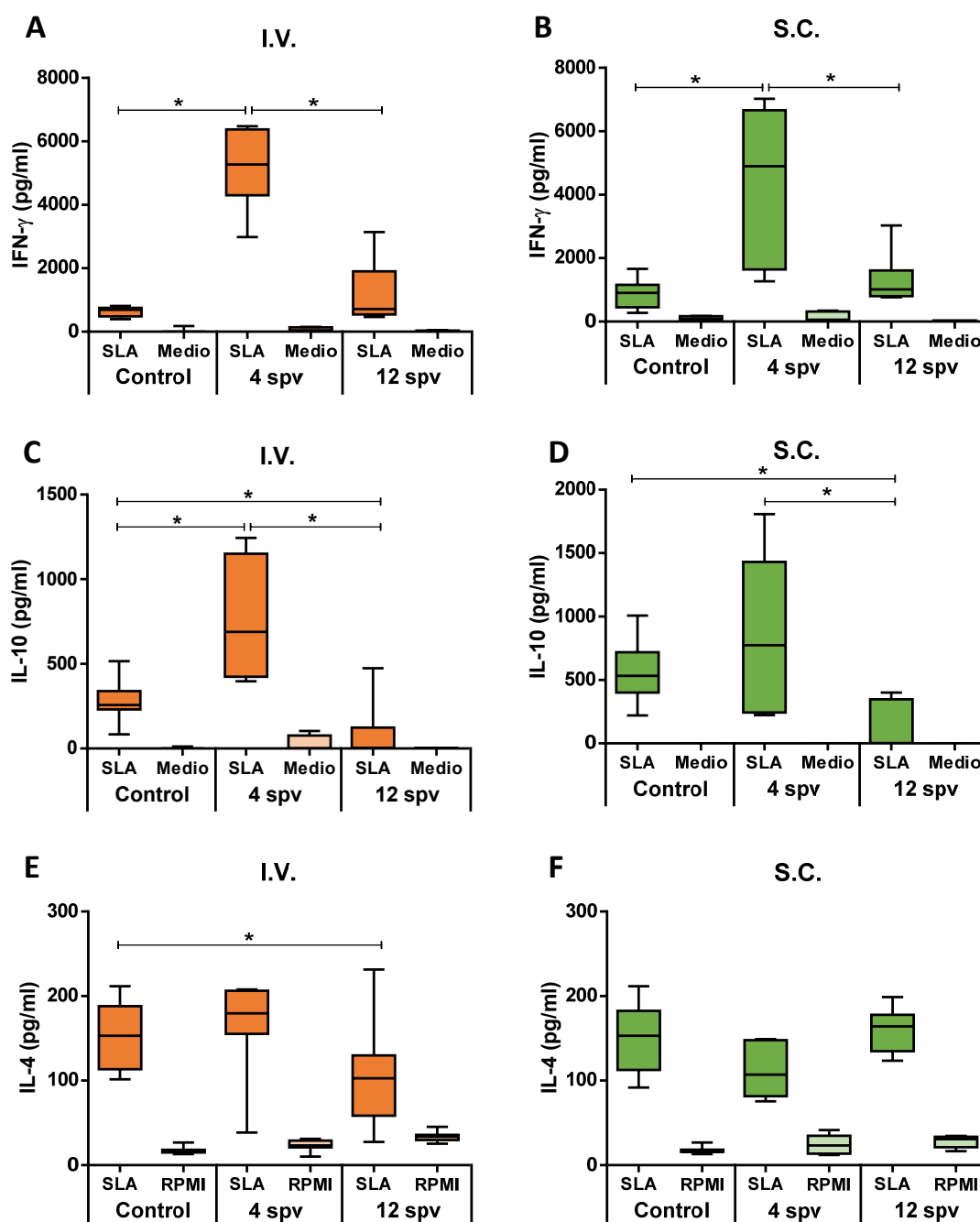
IgG2a fue mayor en los animales infectados 12 semanas posvacunación en las dos vías de inoculación utilizadas. En el modelo C57BL/6 se observó una respuesta polarizada hacia el subtipo IgG2c, tanto en los animales vacunados como en los controles, tras la infección con *L. major* (Figura 4.8C).



**Figura 4.8. Respuesta humoral inducida tras la infección con *L. major*.** Ratones BALB/c (8 animales por grupo), vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía i.v. (A) o s.c. (B), fueron infectados 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) después con  $5 \times 10^4$  promastigotes de *L. major* en la almohadilla plantar. Se determinó mediante ELISA el título de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de SLA 8 semanas después de la infección. (C) Ratones C57BL/6 vacunados por vía s.c. con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* fueron infectados 4 o 12 semanas después con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la dermis de la oreja y 5 semanas después de la infección se determinó el título de anticuerpos IgG1 e IgG2c en el suero. Se representa en un diagrama de barras y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del título de anticuerpos. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos seleccionados según el test de Mann-Whitney se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de al menos dos experimentos independientes.

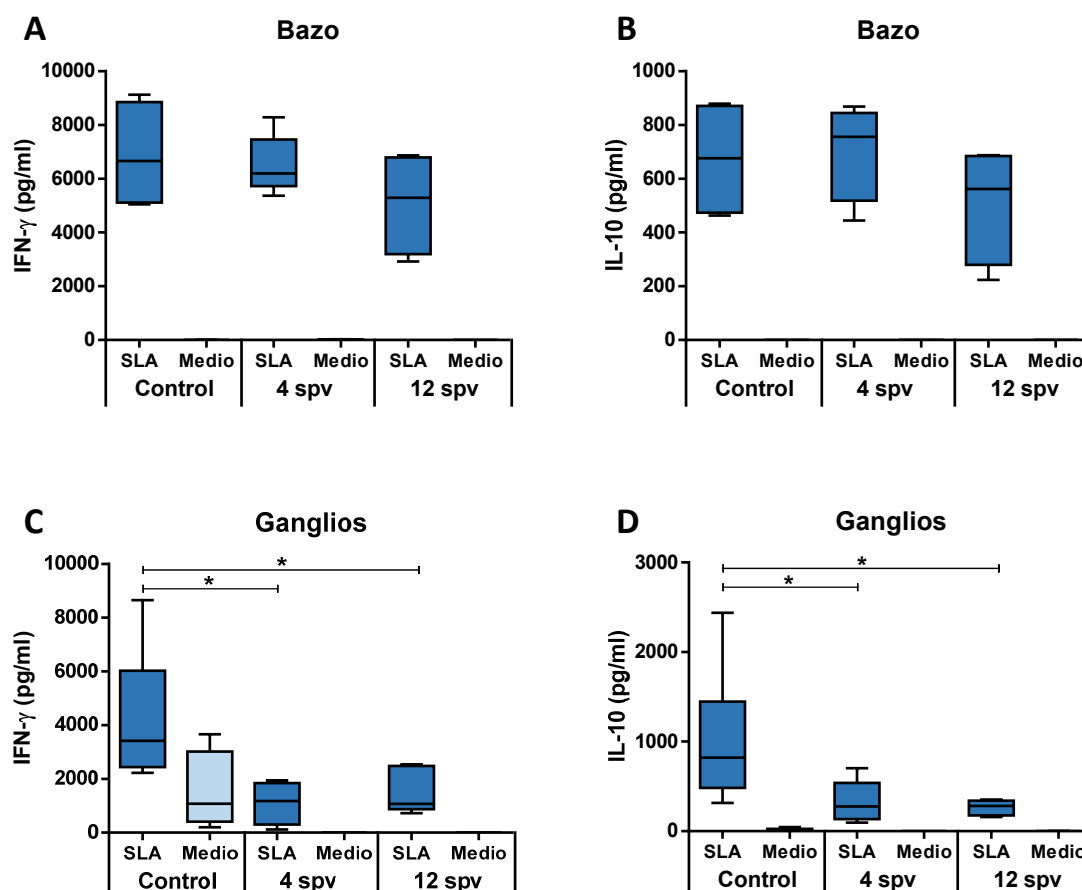
El cambio observado en la polarización de la respuesta humoral en ratones BALB/c vacunados hacia el subtipo IgG2a es indicativo de una respuesta celular de tipo TH1. También se analizó mediante ELISA la producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 en el sobrenadante de esplenocitos cultivados en presencia de SLA (Figura 4.9). Los animales infectados 4 semanas después de la vacunación produjeron cantidades de IFN- $\gamma$  en respuesta a SLA significativamente mayores que los del grupo control, mientras que en aquellos infectados 12 semanas posvacunación, tanto por vía i.v. o s.c., la producción de IFN- $\gamma$  fue más moderada, aunque también mayor que en los controles (Figura 4.9A, 4.9B). De forma similar al IFN- $\gamma$ , se detectó una producción de IL-10 específica de SLA mayor que en los controles en los ratones infectados 4 semanas después de la vacunación. Por el contrario, se observó un descenso en los niveles de IL-10 producidos en las células estimuladas con SLA de los animales infectados 12 semanas posvacunación con respecto al grupo control y también al grupo infectado a las 4 semanas posvacunación (Figura 4.9C, 4.9D). La producción de IL-4 en respuesta a SLA fue similar en los animales vacunados y controles (Figura 4.9E, 4.9F).

En los ratones C57BL/6 vacunados e infectados con *L. major* se analizó la producción de citocinas en respuesta a SLA en cultivos de esplenocitos y células de los ganglios submaxilares, 5 semanas después de la infección. Se observó una fuerte producción de IFN- $\gamma$  antígeno específica en los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos, pero no se encontraron diferencias significativas entre ratones vacunados y controles. Sin embargo, los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por los esplenocitos de los ratones infectados 12 semanas posvacunación fueron menores, aunque no estadísticamente significativos ( $P = 0,54$ ) (Figura 4.10A, 4.10B). Esto está en consonancia con el hecho de que en los cultivos derivados de los ganglios submaxilares se detectaron niveles más altos de IFN- $\gamma$  e IL-10 en el grupo control que en los animales vacunados (Figura 4.10C, 4.10D). Además, se detectó una destacable producción de IFN- $\gamma$  en las células de los ganglios de los ratones control sin estimular con SLA (Medio), seguramente ocasionado por el estado de estimulación de estas células como consecuencia del proceso inflamatorio que presentan estos animales, mientras que en los ratones vacunados no se detectó esta producción basal (Figura 4.10C) al igual que no se produjo lesión inflamatoria tras la infección con *L. major* (Figura 4.7A).



**Figura 4.9. Producción de citocinas en esplenocitos de ratones BALB/c infectados con *L. major*.** Ratones BALB/c (8 animales por grupo), inoculados con PBS (Control) o vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *Li $\Delta$ hsp70-II* por vía i.v. (A, C, E) o s.c. (B, D, F), fueron infectados 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) después con  $5 \times 10^4$  promastigotes de *L. major* en la almohadilla plantar. Los animales se sacrificaron 8 semanas postinfección, sus esplenocitos se cultivaron en presencia o ausencia (Medio) de SLA de *L. major* y se midió la cantidad de citocinas en sobrenadante mediante ELISA. Se representa en un diagrama de cajas y bigotes la mediana y el rango intercuartílico de la concentración de IFN- $\gamma$  (A, B), IL-10 (C, D) e IL-4 (E, F). Las diferencias entre los grupos vacunados y los controles o entre los grupos 4 spv y 12 spv estadísticamente significativas se determinaron con la prueba de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de al menos dos experimentos independientes.





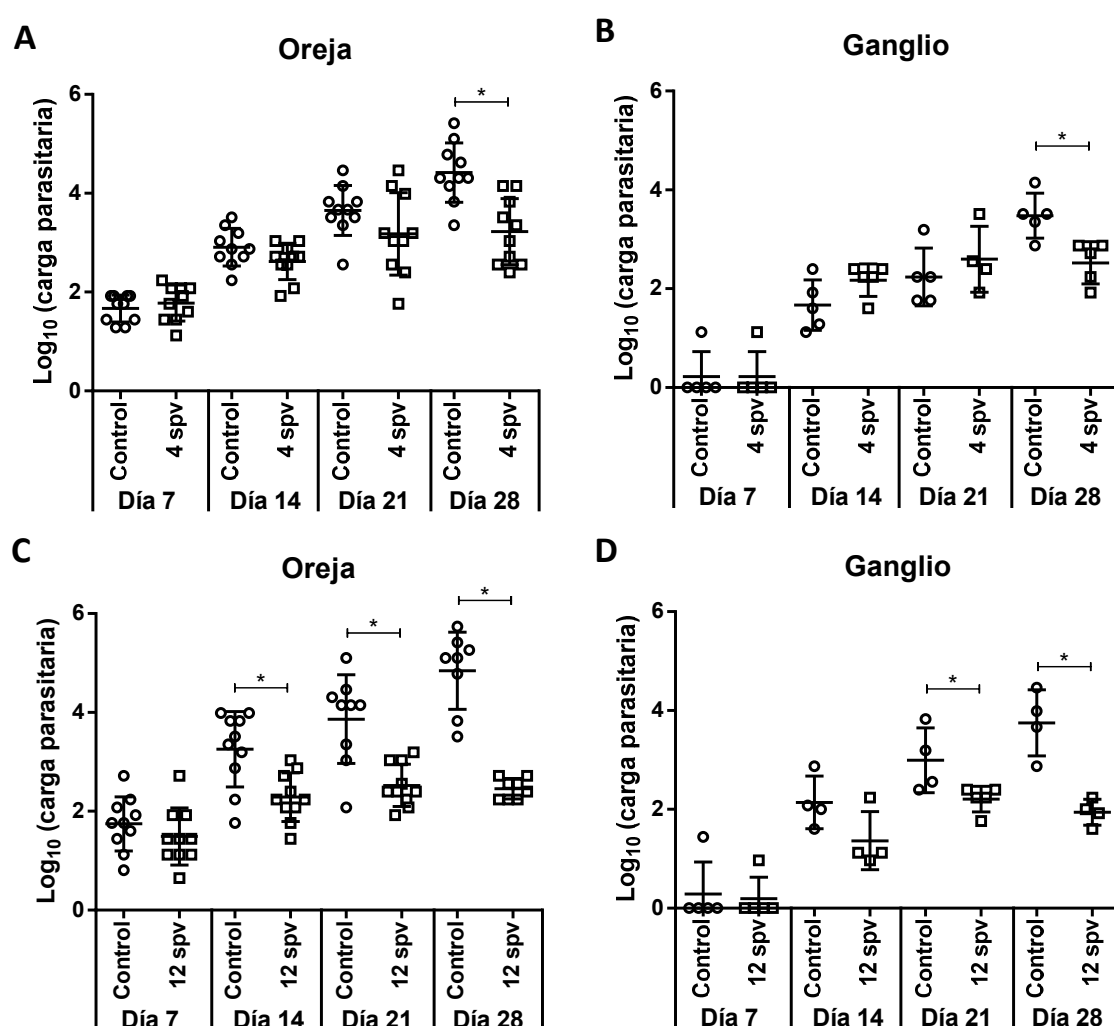
**Figura 4.10. Análisis de la respuesta celular en ratones C57BL6/c infectados con *L. major*.** Ratones C57BL6 (8 animales por grupo), vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o PBS (Control) por vía s.c., fueron infectados 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) después con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la dermis de la oreja. Los animales se sacrificaron 5 semanas después y se midió la concentración de citocinas mediante ELISA en el sobrenadante de las células del bazo (A, B) y de los ganglios submaxilares (C, D) estimuladas en ausencia (Medio) o presencia de SLA de *L. major*. Se representa en un diagrama de cajas y bigotes la mediana y el rango intercuartílico de la concentración de IFN- $\gamma$  (A, C) e IL-10 (B, D). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunados y control se determinaron según el test de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0.05$ ). El resultado mostrado es representativo de al menos dos experimentos independientes.

#### 4.2.3. Respuesta temprana postinfección en ratones C57BL/6

Con el objetivo de poder profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de la inmunidad protectora generada tras la vacunación con *LiΔhsp70-II*, se decidió realizar nuevos ensayos destinados a analizar los parámetros parasitológicos e inmunológicos en las primeras etapas de la infección con *L. major* en ratones C57BL/6.

Ratones C57BL/6 fueron vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía s.c., y 4 o 12 semanas después fueron infectados con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la dermis de la oreja. Cinco animales por grupo fueron sacrificados semanalmente para evaluar la carga parasitaria y la respuesta inmunitaria. Los resultados mostraron que, si bien los parásitos proliferaron de forma similar en ratones vacunados y controles durante los primeros días, la vacunación produjo una limitación del crecimiento en etapas posteriores. Así, en la oreja de los animales vacunados 4 o 12

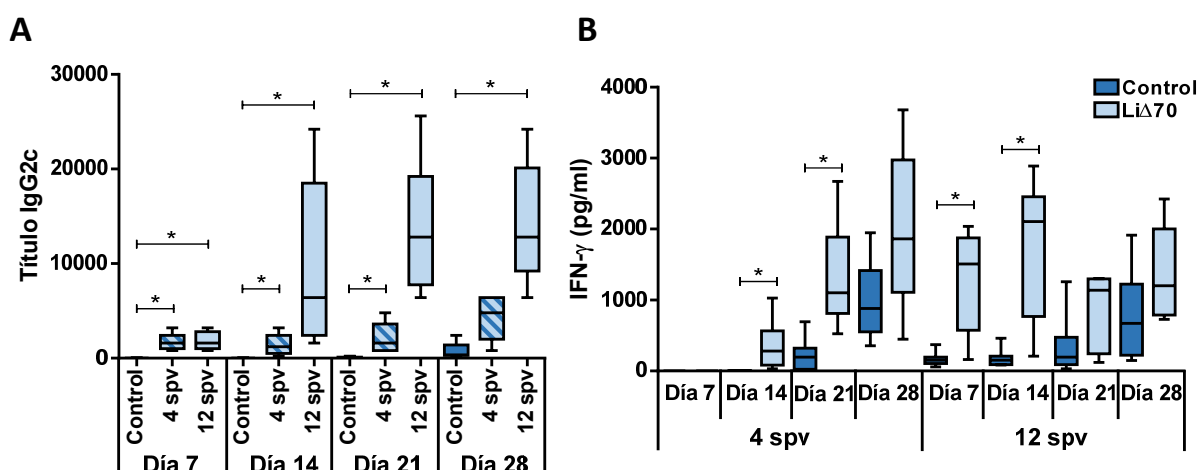
semanas postinfección no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) en el número de parásitos entre los días 14 y 21, ni tampoco entre los días 21 y 28 postinfección, mientras que en la oreja de los ratones control la carga parasitaria fue aumentando semanalmente de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) (Figuras 4.11A y 4.11C). Por otro lado, en los ganglios submaxilares el número de parásitos dejó de aumentar en los animales vacunados a partir del día 14 postinfección (grupo 4 spv) o del día 21 (grupo 12 spv), cuando ya no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los valores de la semana anterior. Por el contrario, en los ganglios submaxilares de los animales control se observó un aumento progresivo del número de (Figuras 4.11B y 4.11D).



**Figura 4.11. La vacunación con *LiΔhsp70-II* promueve un control sobre la multiplicación de *L. major*.** Se inocularon ratones C57BL/6 (5 animales por grupo) con PBS (Control) o  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía s.c., y 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) posvacunación se infectaron con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en ambas orejas. Se sacrificaron semanalmente animales control y vacunados para analizar la carga parasitaria en las orejas (A, C) y los ganglios submaxilares (B, D) mediante dilución límite. Se representa el número de parásitos de cada oreja y de sus correspondientes ganglios drenantes, incluyendo la media y la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el vacunado determinadas mediante la prueba *t* de Student se indican con \* ( $P < 0,05$ ).

El control en la replicación de *L. major* en los ratones vacunados se relaciona con la aparición temprana de anticuerpos del subtipo IgG2c (Figura 4.12A). La intensidad de la respuesta fue mayor en el grupo infectado 12 semanas posvacunación que en el de 4 semanas, aunque las diferencias no fueron significativas. Además, en el sobrenadante del cultivo de los ganglios submaxilares estimulados con SLA, se detectó una producción de IFN- $\gamma$  en los animales vacunados desde los primeros días tras la infección con *L. major*, mientras que en los ratones control la respuesta de IFN- $\gamma$  es más retrasada y de mayor magnitud (Figura 4.12B).

En su conjunto, el análisis durante las primeras semanas postinfección indica que la vacunación con *Li $\Delta$ hsp70-II* estaría induciendo una respuesta inmunitaria específica que responde rápidamente a la infección mediante una respuesta celular moderada de tipo TH1, capaz de controlar la multiplicación de los parásitos antes de que alcancen niveles muy elevados, y se desencadene una respuesta inflamatoria, causante de la subsiguiente lesión cutánea.



**Figura 4.12. La vacunación con *Li $\Delta$ hsp70-II* anticipa la respuesta humoral y celular frente a la infección con *L. major*.** Se administró PBS (Control) o  $1 \times 10^7$  promastigotes de *Li $\Delta$ hsp70-II* a ratones C57BL/6 por vía s.c., y 4 semanas (4 spv) o 12 semanas (12 spv) después se infectaron con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos de *L. major* por vía i.d. en ambas orejas. Semanalmente se determinó mediante ELISA el título de IgG2c anti-SLA en el suero (A) y la producción de IFN- $\gamma$  en las células del ganglio submaxilar en respuesta a SLA (B). Los resultados se representan con un diagrama de cajas y bigotes que indica la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas en el título de anticuerpos y la concentración de IFN- $\gamma$  entre el grupo control y el vacunado se determinaron con la prueba de Kruskal-Wallis y el test *post-hoc* de Dunn (A) o la prueba de Mann-Whitney (B), y se indican mediante \* ( $P < 0,05$ ).

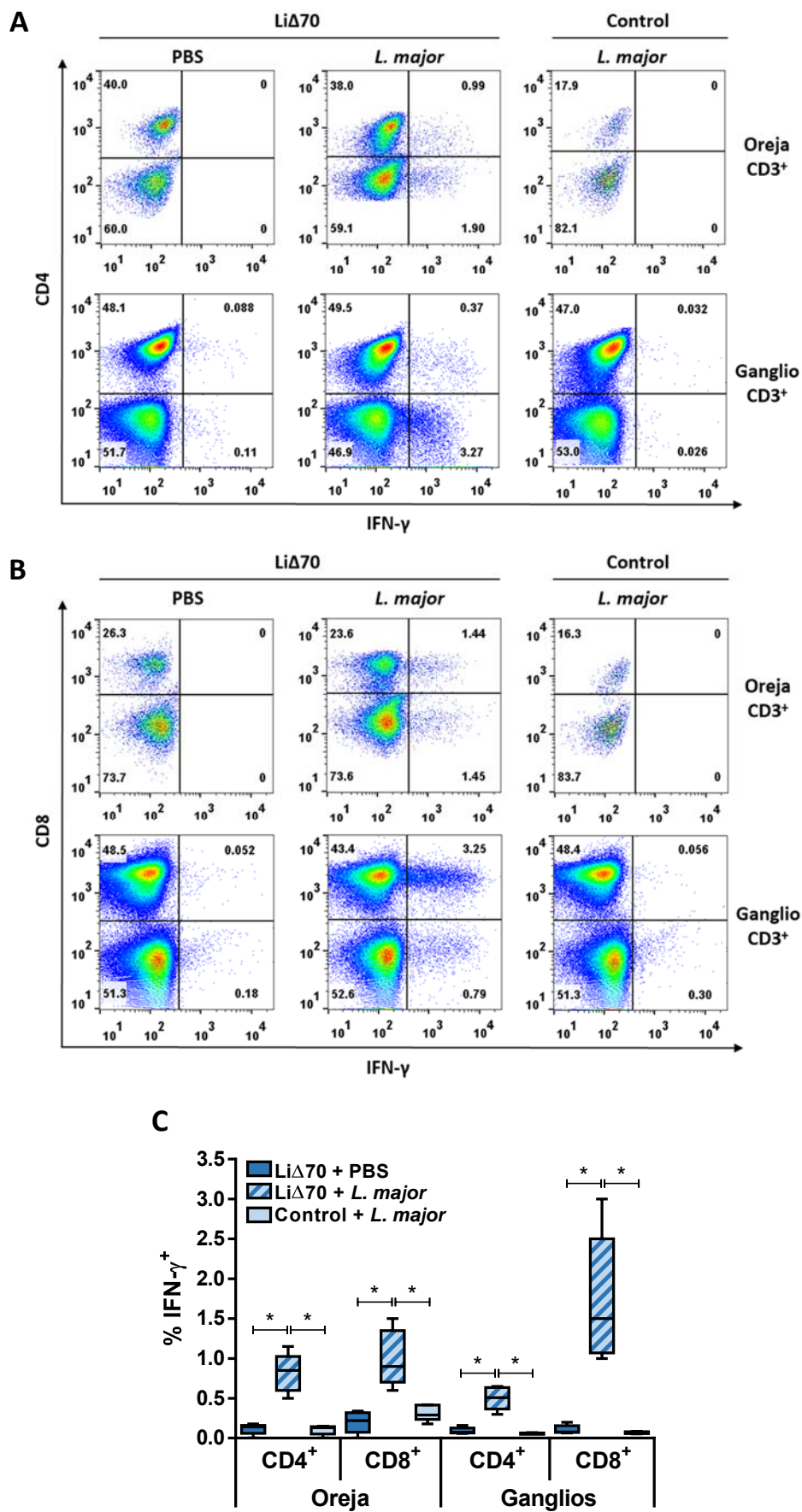
A continuación, se planteó un nuevo ensayo para determinar qué células podrían estar implicadas en la respuesta frente a la infección. Para ello, se vacunaron ratones C57BL/6 con *LiΔhsp70-II* o con PBS (grupo control no vacunado) en la almohadilla plantar y se infectaron 12 semanas después con  $1 \times 10^5$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la oreja. Como control adicional, se incluyó un grupo de animales vacunados a los que se les administró PBS en la oreja en lugar de *L. major* para descartar que la respuesta observada fuera una consecuencia del daño tisular producido por la inoculación.

Se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  presentes en la oreja y en los ganglios submaxilares 3 días después de la infección. En los ratones vacunados se detectaron poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y también linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en ambas localizaciones, ausentes en las muestras de los grupos control (Figura 4.13).

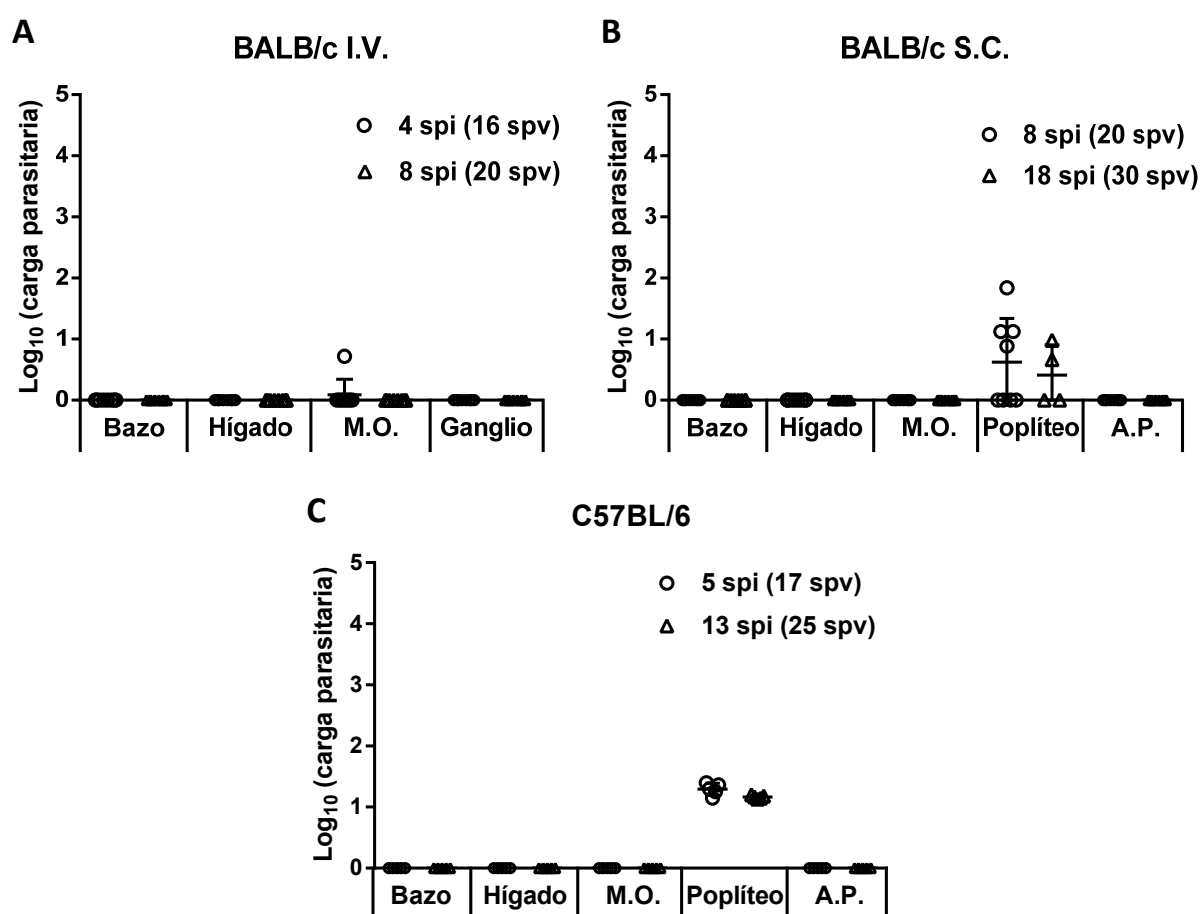
#### **4.2.4. Persistencia de parásitos *LiΔhsp70-II* en animales vacunados y su reactivación tras la infección con *L. major***

La utilización de parásitos vivos como vacuna plantea la posibilidad de que cuando un animal vacunado se infecte con una cepa virulenta se pudiera generar una respuesta que favoreciera la reactivación de la cepa atenuada utilizada como vacuna, lo que podría plantear dudas sobre su bioseguridad. Por ello, se planteó un ensayo para analizar la evolución de los parásitos *LiΔhsp70-II* persistentes en los ratones vacunados, una vez estos animales fueron infectados con *L. major*. Se determinó la carga parasitaria en distintos órganos mediante dilución límite, en un medio que incluye los antibióticos de selección higromicina y geneticina, de forma que únicamente pueden desarrollarse aquellos parásitos de la línea *LiΔhsp70-II*.

Como se muestra en la Figura 4.14, la infección con la cepa virulenta no produjo una reactivación de la proliferación de los parásitos *LiΔhsp70-II* persistentes en animales BALB/c y C57BL/6 vacunados 12 semanas antes de la infección con *L. major*, ni alteró la tendencia observada en la Figura 4.1. La inoculación i.v. permitió la colonización de los órganos internos, pero los parásitos desaparecieron paulatinamente hasta ser detectados únicamente en la médula ósea de un animal (Figura 4.14A). Cuando la vía de vacunación fue s.c., los parásitos *LiΔhsp70-II* quedaron confinados en la almohadilla plantar de los ratones BALB/c, donde no fueron detectados 20 semanas después, y en el ganglio poplíteo, donde se encontraron en torno a 10 parásitos en algunos animales (Figura 4.14B). Por otro lado, en los ratones C57BL/6, la cepa *LiΔhsp70-II* parece permanecer indefinidamente en el ganglio poplíteo, aunque en muy bajo número (alrededor de 10 parásitos) (Figura 4.14C).



**Figura 4.13. Análisis de la respuesta celular temprana en el sitio de infección con *L. major*.** Se administró PBS (Control) o  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* a ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) por vía s.c. en la almohadilla plantar. Después de 12 semanas, los ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* fueron infectados con  $1 \times 10^5$  promastigotes metacíclicos de *L. major* en la oreja o inoculados con PBS. El grupo de ratones control también fue infectado con *L. major*. Tres días después de la infección, los animales fueron sacrificados y las células de la oreja y los ganglios submaxilares fueron estimuladas *ex vivo* con anti-CD3 y anti-CD28 para, a continuación, cuantificar las poblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup> productores de IFN-γ mediante citometría de flujo. Se muestra un panel representativo de la expresión de CD4 e IFN-γ (A) o CD8 e IFN-γ (B) en la población de células CD3<sup>+</sup>. En (C) se muestra un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de células IFN-γ<sup>+</sup> en la población CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en los distintos grupos de animales analizados. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado e infectado con *L. major* y el grupo control o el grupo vacunado no infectado, se determinaron mediante el test de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.



**Figura 4.14. Evolución de los parásitos *LiΔhsp70-II* persistentes tras la infección con *L. major*.** Ratones BALB/c (A, B) (8 animales por grupo) y C57BL/6 (C) (5 animales por grupo) fueron vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía i.v. en la cola (A) o por vía s.c. en la almohadilla plantar derecha (B, C). Doce semanas después se infectaron con *L. major* en la almohadilla plantar izquierda con  $5 \times 10^4$  promastigotes (A, B) o en la dermis de la oreja con  $1 \times 10^3$  promastigotes metacíclicos (C). Se analizó la carga parasitaria de *LiΔhsp70-II* por dilución límite, utilizando los antibióticos de selección G418 e higromicina en el medio de diferenciación. Se muestra en un gráfico de dispersión el número de parásitos en cada animal, la media y la desviación estándar, en el bazo, el hígado, la médula ósea del fémur (M.O.), el ganglio poplíteo de la pata vacunada y la almohadilla plantar utilizada para la vacunación (A.P.). El resultado mostrado es representativo de al menos dos experimentos.

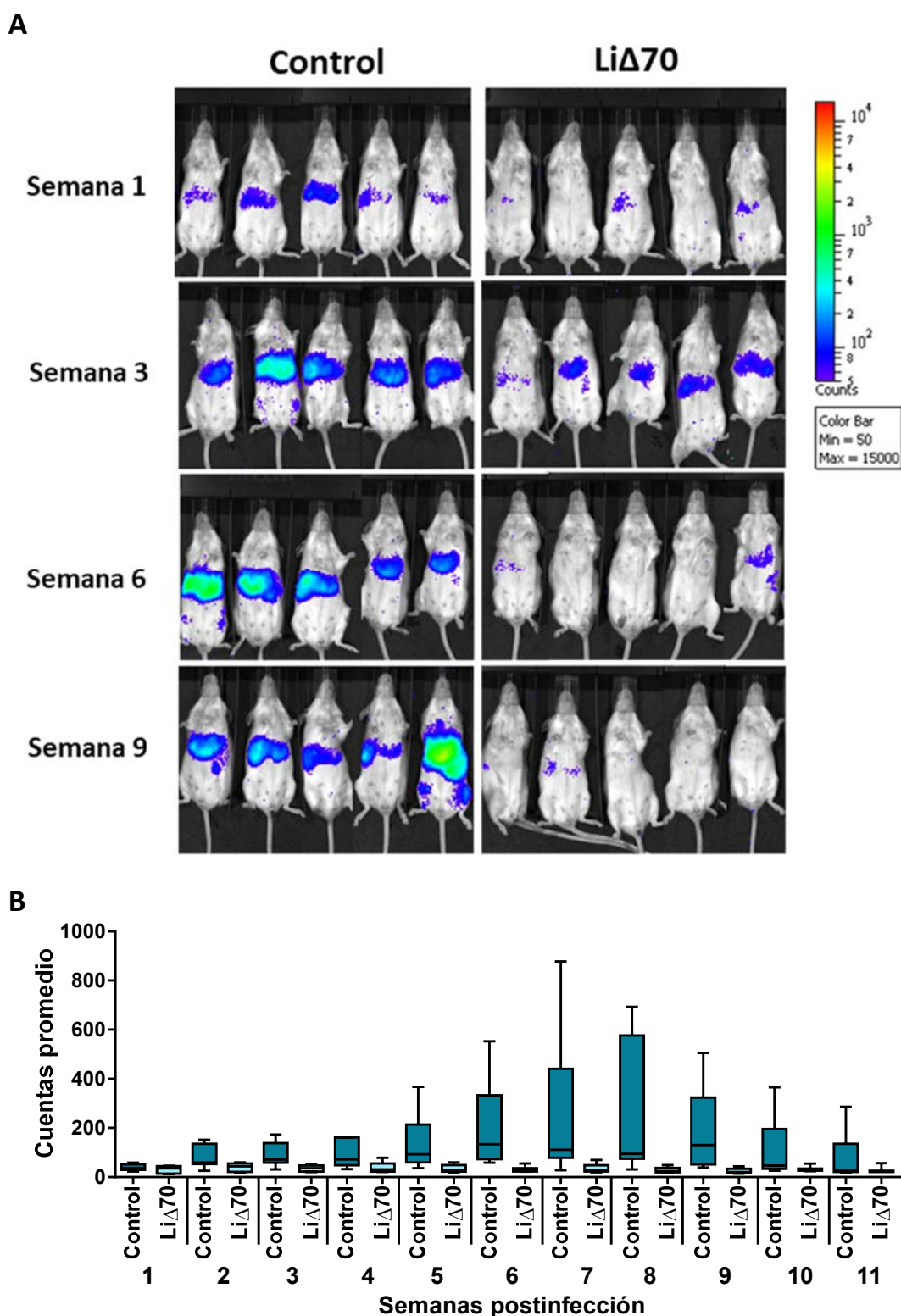
### **4.3. Evaluación de la vacuna *LiΔhsp70-II* frente a la infección con *L. infantum***

Se realizaron ensayos dirigidos a evaluar si la vacunación con esta cepa atenuada también tiene un efecto profiláctico ante una infección con una especie visceral como *L. infantum*. Teniendo en cuenta los resultados de inmunización y protección en *L. major*, se decidió utilizar la vía s.c. de vacunación, que produce una infección localizada pero inductora de una respuesta inmunitaria generalizada, y ensayar directamente su capacidad profiláctica a largo plazo (12 semanas posvacunación en ratón).

#### **4.3.1. *LiΔhsp70-II* confiere protección frente a la infección con *L. infantum***

Se vacunaron ratones BALB/c con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o PBS (Control) en la almohadilla plantar y se infectaron 12 semanas después con  $1 \times 10^8$  promastigotes en fase estacionaria de una cepa de *L. infantum* que expresa luciferasa para poder hacer el seguimiento de la infección *in vivo* mediante el sistema IVIS® sin necesidad de sacrificar a los animales.

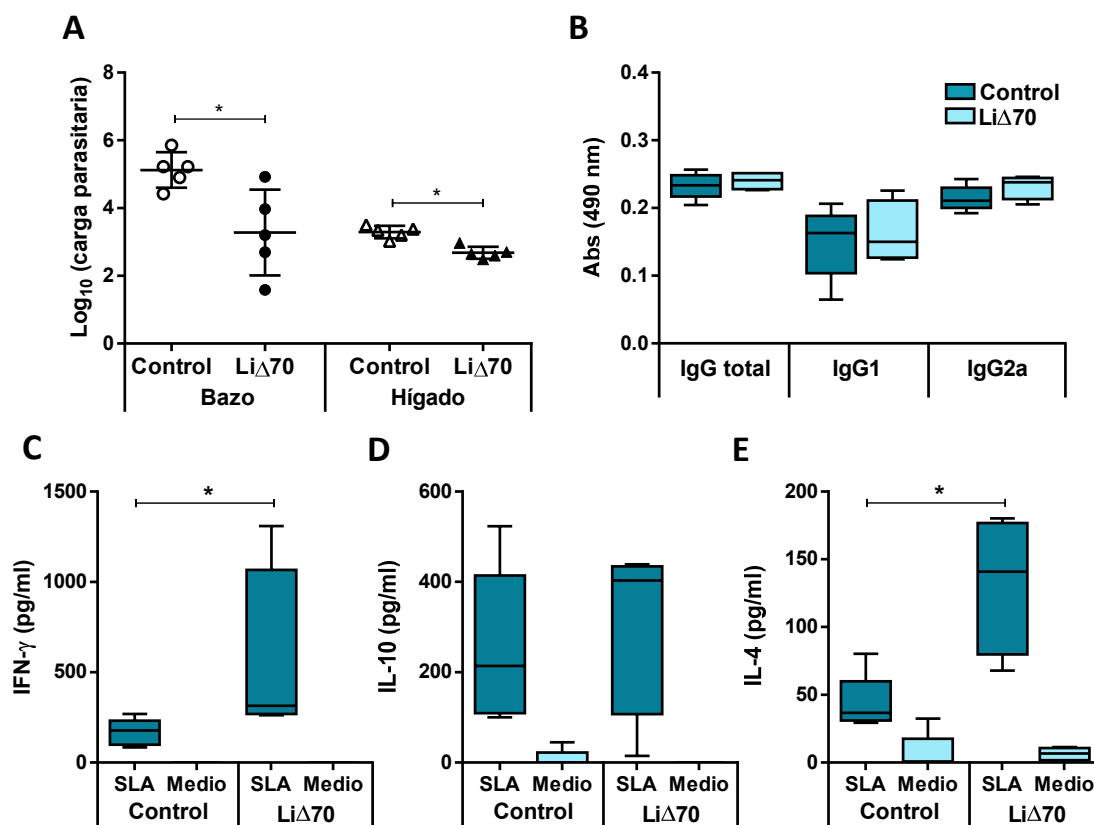
En la Figura 4.15 se muestra la evolución de la carga parasitaria, donde, en el grupo control, se observa una proliferación de *L. infantum* en las vísceras desde la primera semana y que va aumentando hasta la novena semana, cuando la señal de bioluminiscencia comenzó a descender. Sin embargo, en los ratones vacunados la señal de bioluminiscencia fue indetectable o muy baja a lo largo de todo el experimento; en la tercera semana postinfección se alcanzó la máxima señal y, a partir de entonces, la cantidad de parásitos disminuyó progresivamente (Figura 4.15).



**Figura 4.15. Evolución de la infección con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (5 animales por grupo) vacunados por vía s.c. con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control) fueron infectados 12 semanas después por vía i.v. con  $1 \times 10^8$  promastigotes de una cepa de *L. infantum* que expresa luciferasa. Para el seguimiento *in vivo* de la infección se suministró a los ratones infectados luciferina por vía i.p. y se tomaron imágenes utilizando el sistema IVIS®. En (A) se muestran imágenes representativas del experimento en distintas semanas postinfección. En (B) se representa el resultado en un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico de las cuentas promedio de luminiscencia que el programa de análisis determina para cada animal. El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.



Los animales se sacrificaron 11 semanas después de la infección para analizar los parámetros parasitológicos e inmunológicos al final del ensayo. Se encontró un número 100 veces menor de parásitos en el bazo y 4 veces menor en el hígado de los animales vacunados con *LiΔhsp70-II* con respecto al grupo control (Figura 4.16A). Entre los grupos control y vacunados, no se observaron diferencias en la reactividad de los anticuerpos IgG anti-SLA, ni en los subtipos IgG1 e IgG2a, presentes en los sueros de los animales (Figura 4.16B). Sin embargo, sí se encontraron diferencias en la respuesta celular tras la estimulación de los esplenocitos con SLA. En las muestras procedentes de los animales vacunados, se observó una mayor producción específica de antígeno de IFN- $\gamma$  (Figura 4.16C) y de IL-4 (Figura 4.16E) que en las muestras de los ratones no vacunados. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-10 por esplenocitos estimulados con SLA, cuando se comparan ambos grupos de animales (Figura 4.16D).

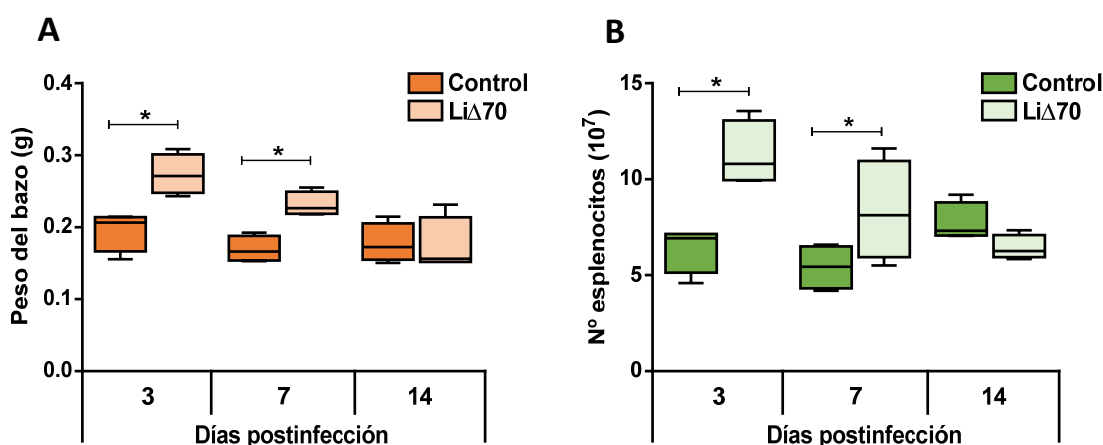


**Figura 4.16. Análisis parasitológico e inmunológico de los animales infectados con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (5 animales por grupo), vacunados por vía s.c. con  $1 \times 10^7$  promastigotes *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control), fueron infectados 12 semanas después por vía i.v. con  $1 \times 10^8$  promastigotes de una cepa de *L. infantum* que expresa luciferasa. Los animales se sacrificaron 11 semanas postinfección y se determinó la carga parasitaria en bazo e hígado mediante dilución límite (A). El número de parásitos de cada animal, junto con la media y la desviación estándar de cada grupo se representa en un gráfico de dispersión. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo vacunado se determinaron mediante la prueba *t* de Student y se indican mediante \* ( $P < 0,05$ ). Se midió la reactividad a 490 nm de los anticuerpos IgG, IgG1 e IgG2a específicos de SLA en el suero de los animales (B). Se determinó mediante ELISA la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 en el sobrenadante de esplenocitos estimulados durante 72 h con SLA o Medio (C, D y E, respectivamente). Los resultados de la respuesta humoral y celular se representan en diagramas de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados se determinaron según el test de Kruskal-Wallis (B) o Mann-Whitney (C, D, E) y se indican mediante \* ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.2. La infección con *L. infantum* induce una respuesta inmunitaria temprana en el bazo de los animales vacunados

Se estudió la respuesta inmunitaria durante los primeros días en el bazo tras la infección con *L. infantum* en los ratones vacunados con *LiΔhsp70-II*. Así, grupos de ratones BALB/c, inmunizados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* en la almohadilla plantar o inoculados con PBS (Control), se infectaron 12 semanas después con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* JPCM5 por vía i.v. Los animales se sacrificaron 3, 7 y 14 días postinfección para realizar el análisis.

En el bazo de los ratones vacunados se observó un mayor peso del órgano y mayor número de células con respecto al grupo control 3 días después de la infección con *L. infantum* (Figura 4.17). Una semana después los valores fueron menores, hasta equipararse con los del grupo control a los 14 días postinfección.

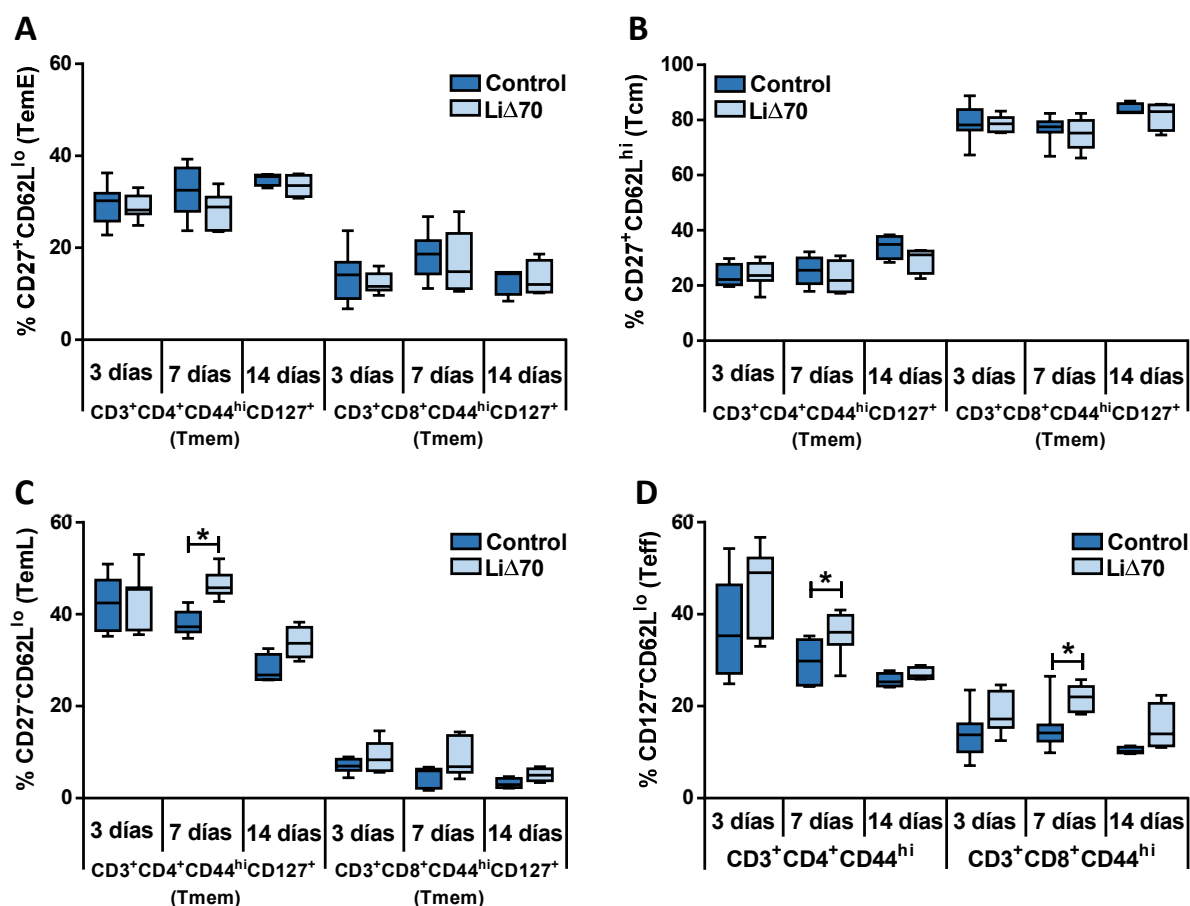


**Figura 4.17. Peso del bazo y número de células en animales infectados con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (4 animales por grupo) fueron inoculados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* por vía s.c. o PBS (Control) y 12 semanas después se infectaron con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* por vía i.v. Se realizaron sacrificios a los 3, 7 o 14 días postinfección, se pesó el bazo de los animales (A) y se procesó el órgano para determinar el número de esplenocitos (B). Se representan los resultados en un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del peso o el número de células. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y el grupo control según la prueba de Mann-Whitney se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

#### 4.3.3. Caracterización de los linfocitos T implicados en la respuesta temprana a la infección con *L. infantum*

A continuación, se planteó analizar la dinámica de las poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  efectoras y de memoria que podrían estar implicadas en el control de la infección en los animales vacunados. Los esplenocitos de los animales infectados se analizaron *ex vivo* mediante citometría de flujo y se determinaron los siguientes fenotipos de expresión de marcadores asociados a las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$ : memoria central (TCM,  $CD44^{hi} CD127^+ CD62L^{high} CD27^+$ ), memoria efectora temprana (TEME,  $CD44^{hi} CD127^+ CD62L^{low} CD27^+$ ), memoria efectora tardía (TEML,

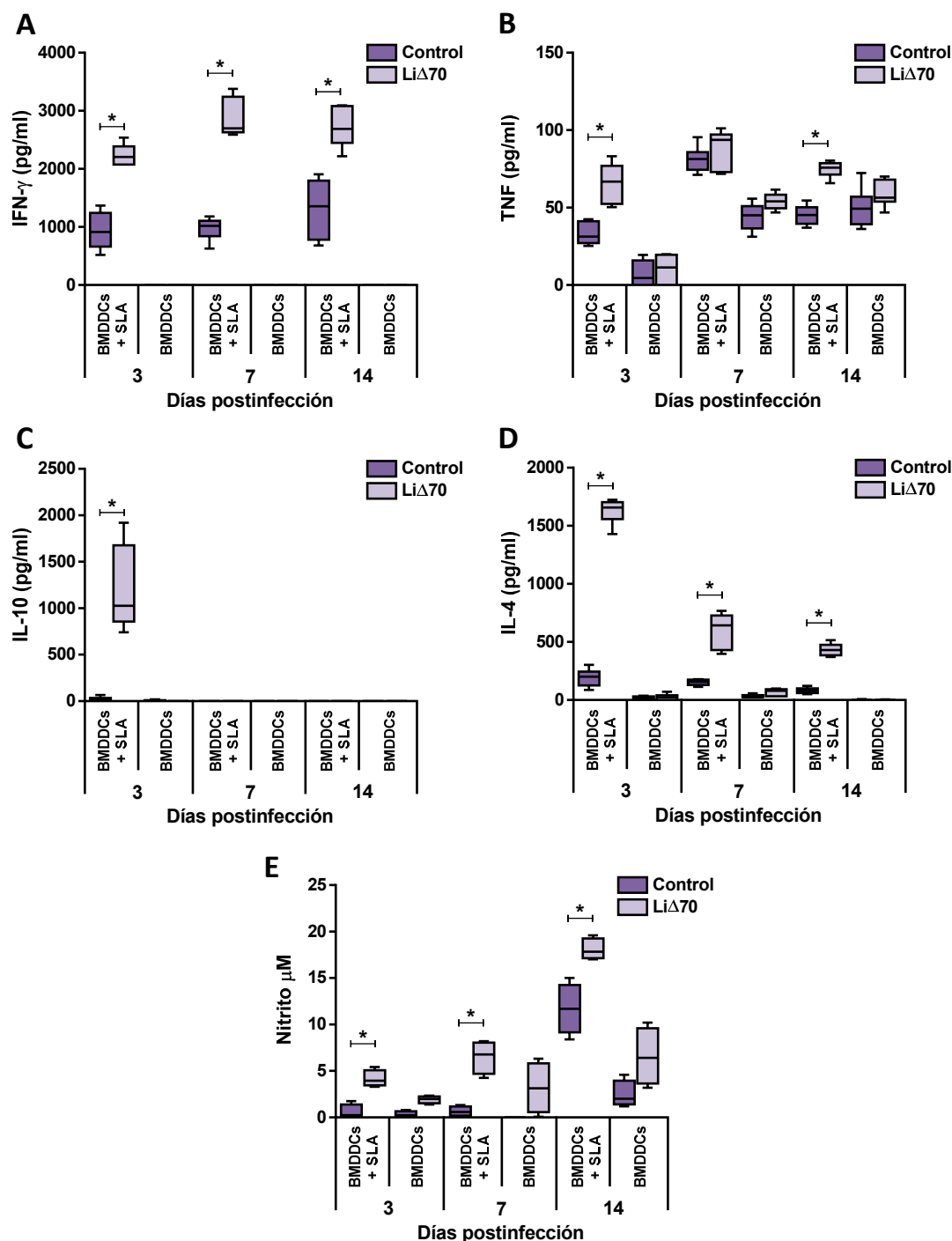
CD44<sup>hi</sup> CD127<sup>+</sup> CD62L<sup>low</sup> CD27<sup>-</sup>) y linfocitos T efectores (TEFF, CD44<sup>hi</sup> CD127<sup>-</sup> CD62L<sup>low</sup>). No se observaron diferencias en la población de linfocitos T de memoria temprana (TEM), ya fueran CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, con respecto al grupo control (Figura 4.18A), ni tampoco en los linfocitos T de memoria central (TCM) (Figura 4.18B). Sin embargo, 7 días después de la infección, se detectó un aumento en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> efectoras de memoria tardía (TEML) (Figura 4.18C) y también de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> totalmente diferenciadas hacia la respuesta efectora (TEFF) (Figura 4.18D).



**Figura 4.18. Poblaciones de linfocitos efectoras y de memoria en ratones infectados con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (4 animales por grupo), vacunados por vía s.c. en la almohadilla plantar con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control), fueron infectados 12 semanas después con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* por vía i.v. Los animales se sacrificaron 3, 7 o 14 días postinfección y se caracterizaron las poblaciones de linfocitos T en el bazo por citometría de flujo. Los esplenocitos se marcaron *ex vivo* con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD127 y anti-CD27, marcados con diferentes fluorocromos. Se representa un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de 3 subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> pertenecientes a la población de linfocitos T de memoria (Tmem) (CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup>): memoria efectora temprana CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup> (TEME) (A), memoria central CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>CD27<sup>-</sup> (TCM) (B) y memoria efectora tardía CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup> (TEML) (C). En (D) se representa el porcentaje de linfocitos T efectoras CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>-</sup>CD62L<sup>low</sup> (TEFF) en la población de linfocitos T activados (CD44<sup>hi</sup>). Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo vacunado se determinaron mediante la prueba de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

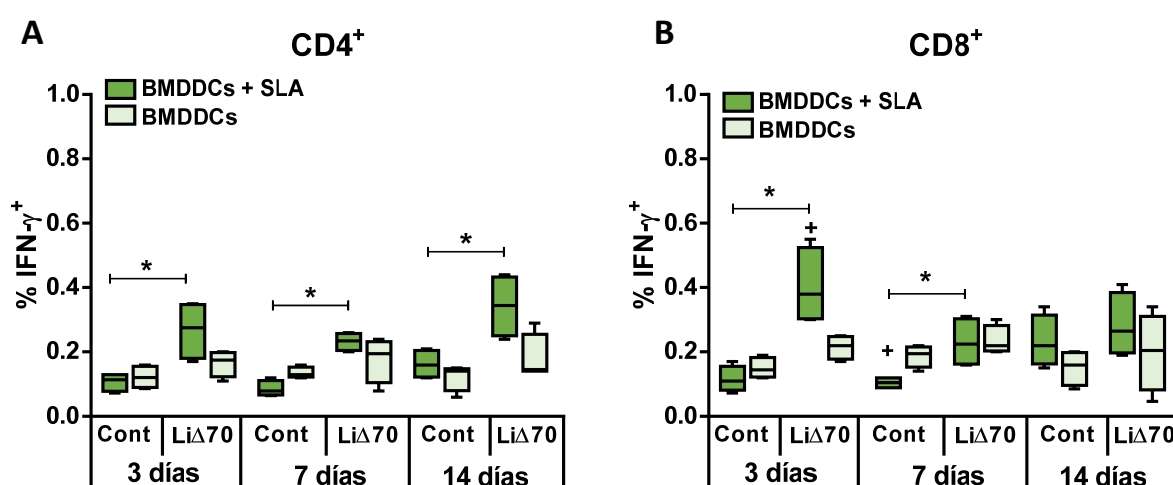
#### 4.3.4. Análisis de la respuesta efectora temprana en los animales infectados con *L. infantum*

Para profundizar en el estudio del tipo de respuesta efectora se analizó la producción de algunas citocinas en esplenocitos estimulados con BMDDCs pre-incubadas o no con SLA (Figura 4.19). En los tres tiempos analizados (3, 7 y 14 días postinfección) se observó una mayor producción de IFN- $\gamma$  específica de antígeno en los ratones vacunados que en los animales del grupo control (Figura 4.19A). Tres días después de la infección con *L. infantum* se detectó una mayor producción de TNF específica de antígeno en los animales vacunados con respecto al control. Sin embargo, a partir de los 7 días se observó que los esplenocitos obtenidos de los animales control también comenzaron a producir TNF, y también aumentaron los niveles en las células sin estimulación SLA-específica (Figura 4.19B). También se observó 3 días después de la infección una producción significativa de IL-10 específica de antígeno en los ratones vacunados, pero no se detectó IL-10 en los animales control ni en los animales vacunados analizados a tiempos más largos postinfección (Figura 4.19C). En los 3 primeros días postinfección, también se detectó en los animales vacunados un incremento en la producción de IL-4 con respecto al grupo control (Figura 4.19D). Los niveles de IL-4 disminuyeron con el tiempo, pero siempre fueron mayores en los animales vacunados que en los controles. Por último, se determinó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa en los esplenocitos mediante la detección de nitritos en los sobrenadantes del cultivo. Los niveles de nitritos detectados siempre fueron significativamente mayores en los cultivos de esplenocitos derivados de los animales vacunados que en los procedentes de los ratones control (Figura 4.19E).



**Figura 4.19. Producción de citocinas en el bazo de ratones infectados con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (4 animales por grupo) fueron vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *Li $\Delta$ hsp70-II* o inoculados con PBS (Control) por vía s.c. en la almohadilla plantar. Doce semanas después, se infectaron por vía i.v. con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum*. Se sacrificaron los animales a los 3, 7 y 14 días postinfección y los esplenocitos se estimularon durante 48 h con BMDDCs incubadas previamente o no con SLA. Se analizó en los sobrenadantes la producción de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C) e IL-4 (D) mediante ELISA. En (E) se determinó mediante la reacción de Griess la concentración de nitrito liberado, como reflejo de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa. Los resultados se representan mediante un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico de la concentración de cada citocina. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba de Mann-Whitney y se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

Por otro lado, se analizó mediante citometría de flujo el fenotipo de los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  (Figura 4.20). En los esplenocitos procedentes de los animales vacunados y sacrificados a los 3, 7 y 14 días postinfección, se observó un porcentaje significativamente mayor de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  que en los controles en respuesta a la estimulación con BMDDCs incubadas con SLA (Figura 4.20A). El porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  también fue significativamente mayor en los animales vacunados cuando se analizó 3 y 7 días después de la infección, aunque no lo fue en las muestras de los animales sacrificados en el día 14 postinfección (Figura 4.20B).



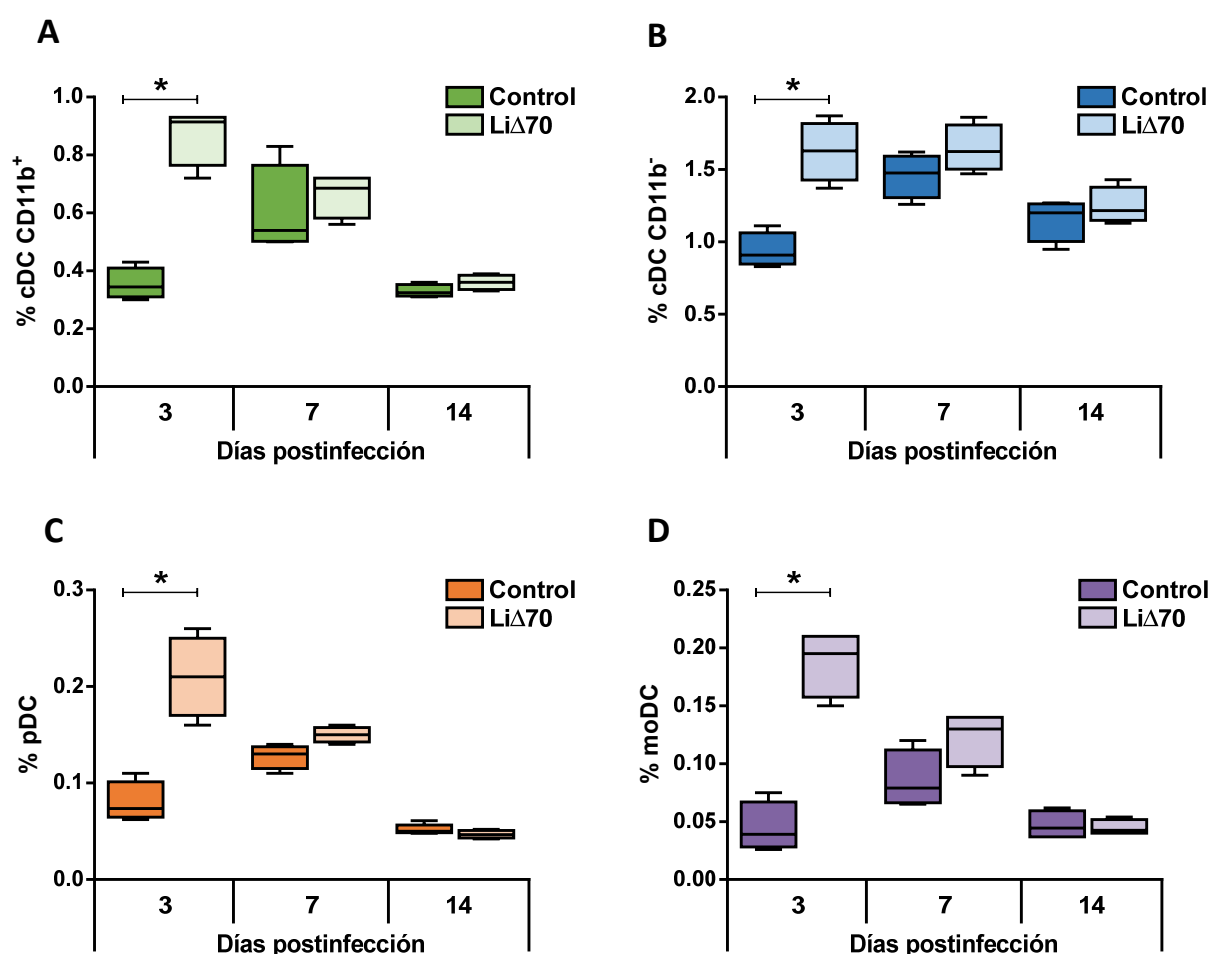
**Figura 4.20. Caracterización de los linfocitos T responsables de la producción antígeno específica de IFN- $\gamma$ .** Se infectó por vía i.v. con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum* a ratones BALB/c (4 animales por grupo) vacunados 12 semanas antes con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *Li $\Delta$ hsp70-II* (Li $\Delta$ 70) o inoculados con PBS (Cont) por vía s.c. en la almohadilla plantar. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos postinfección (3, 7 y 14 días) y los esplenocitos fueron incubados durante 16 h con BMDDCs previamente incubadas o no con SLA. Se analizó mediante citometría de flujo la expresión de IFN- $\gamma$  en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B). Se representan los resultados en un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de células de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Las diferencias estadísticamente significativas entre las células estimuladas con BMDDCs cargadas o no con SLA se indican con + ( $P < 0,05$ ) y aquellas entre los animales vacunados y los controles con \* ( $P < 0,05$ ) según la prueba de Mann-Whitney. El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

#### 4.3.5. Aumento en la frecuencia de células dendríticas en el bazo como respuesta temprana a la infección con *L. infantum* en animales vacunados

Se analizaron mediante citometría de flujo distintas poblaciones de células dendríticas en el bazo de ratones BALB/c, previamente vacunados o no, a los 3, 7 y 14 días después de haber sido infectados con *L. infantum* (Figura 4.21). Las células dendríticas convencionales (cDC) se determinaron por su fenotipo MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> y se clasificaron en función de su expresión de CD11b. En la figura, se muestran los porcentajes de cDC CD11b<sup>+</sup> (Figura 4.21A) y cDC CD11b<sup>-</sup> (Figura 4.21B). También se analizó el porcentaje de células dendríticas plasmacitoides (pDC) MHC-II<sup>lo</sup> CD11c<sup>int</sup> CD11b<sup>-</sup> Ly6C<sup>hi</sup>

(Figura 4.21C) y, por último, el de las células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> (Figura 4.21D).

En los bazo de los ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* y sacrificados 3 días después de la infección se observó un incremento, con respecto a las muestras de los ratones control, en todos los tipos de células dendríticas analizados. En los esplenocitos procedentes de los animales sacrificados a los 7 o 14 días postinfección ya no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4.21).

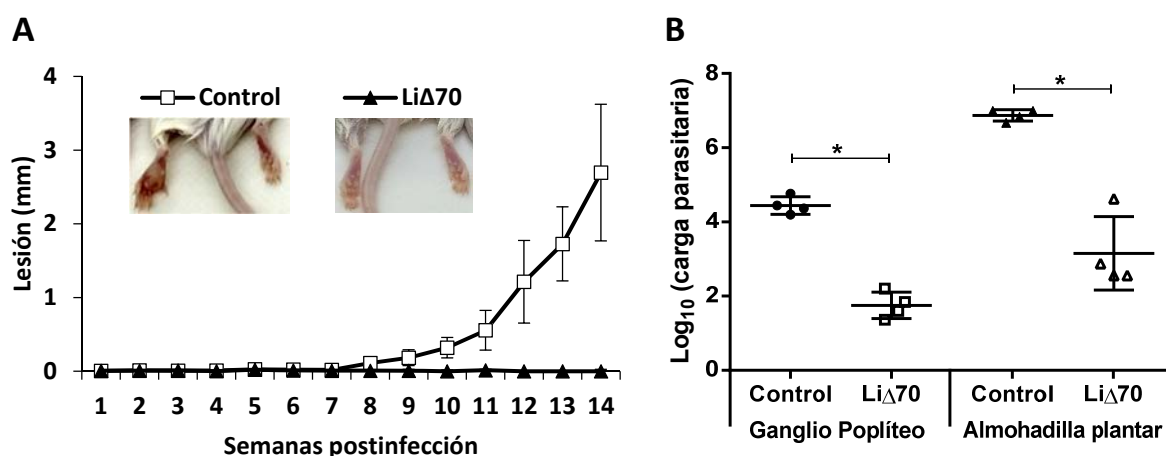


**Figura 4.21. Análisis de las poblaciones de células dendríticas en el bazo de animales vacunados y posteriormente retados con *L. infantum*.** Ratones BALB/c (4 animales por grupo), vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control) por vía s.c., fueron infectados 12 semanas después por vía i.v. con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. infantum*. Los animales se sacrificaron a los 3, 7 o 14 días tras la infección y los esplenocitos se analizaron *ex vivo* mediante citometría de flujo para determinar las siguientes poblaciones de células dendríticas: células dendríticas convencionales (cDC) MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (A) o CD11b<sup>-</sup> (B), células dendríticas plasmacitoides (pDC) MHC-II<sup>lo</sup> CD11c<sup>int</sup> CD11b<sup>-</sup> Ly6C<sup>+</sup> (C) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDC) MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> (D). Se representa un diagrama de cajas y bigotes con la mediana y el rango intercuartílico del porcentaje de células de cada grupo en relación al total de esplenocitos. Las diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann-Whitney se indican con \* ( $P < 0,05$ ). El resultado mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

#### 4.4. Protección frente a otras especies de *Leishmania*

De acuerdo con los datos mostrados hasta aquí, se puede concluir que la vacunación con la cepa atenuada *LiΔhsp70-II* confiere protección en ratón frente a la infección con una especie causante de leishmaniosis cutánea, como es *L. major*, y también frente a *L. infantum*, agente causal de leishmaniosis visceral. Para determinar si esta vacuna atenuada también pudiera servir para prevenir la infección por especies del continente americano, se realizaron estudios preliminares con otras dos especies prototípicas de *Leishmania*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.

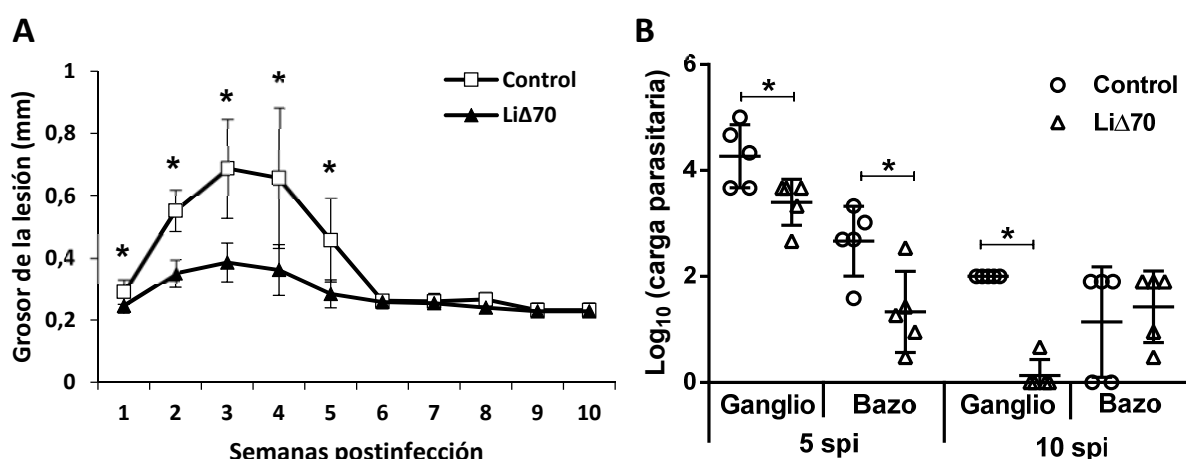
*L. amazonensis* está asociada a casos de leishmaniosis cutánea, cutánea difusa y mucocutánea en América (Barral et al., 1991). En el modelo de ratón causa una lesión ulcerativa en el sitio de infección debido al aumento en el número de parásitos (Pereira and Alves, 2008). Si bien, cuando la infección s.c. con  $5 \times 10^4$  promastigotes de *L. amazonensis* se hizo sobre ratones BALB/c, vacunados 12 semanas antes por vía s.c. con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II*, no se observó ninguna lesión en el sitio de infección, a diferencia de lo que ocurre en los ratones control (Figura 4.22A). Asimismo, se observó una disminución en el número de parásitos en la almohadilla plantar infectada y en el ganglio poplíteo drenante al sitio de infección (Figura 4.22B).



**Figura 4.22. La vacunación con *LiΔhsp70-II* protege frente a la infección con *L. amazonensis*.** Ratones BALB/c (4 ratones por grupo) fueron vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control) por vía s.c. en la almohadilla plantar. Los animales se infectaron 12 semanas después con  $5 \times 10^4$  promastigotes de *L. amazonensis* en la almohadilla plantar de la pata contraria a la vacunada. El tamaño de la lesión se midió semanalmente por la hinchazón de la almohadilla plantar de la pata infectada con respecto a la de la pata no infectada (A). Los animales se sacrificaron 14 semanas postinfección y se determinó el número de parásitos en el ganglio poplíteo mediante dilución límite (B). Se representa la media y la desviación estándar del tamaño de la lesión (A) y el número de parásitos de cada animal, además de la media y la desviación estándar (B). Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y el control fueron determinadas con la prueba *t* de Student y se indican con \* ( $P < 0,001$ ).



Por otro lado, *L. braziliensis* es un agente causal de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea en América. La infección i.d. en la oreja de ratones BALB/c con *L. braziliensis* produce una lesión inflamatoria que cura espontáneamente dejando una cicatriz (de Moura et al., 2005). Cuando un grupo de ratones BALB/c, vacunados por vía s.c. con *LiΔhsp70-II*, fueron infectados con *L. braziliensis* 12 semanas después de la vacunación, los animales desarrollaron una lesión inflamatoria significativamente menor que los ratones control (Figura 4.23A). Igualmente, el número de parásitos presentes en el ganglio drenante del sitio de infección y en el bazo fueron significativamente menores que los encontrados en los ratones control (Figura 4.23B).



**Figura 4.23. La vacunación con *LiΔhsp70-II* protege frente a la infección con *L. braziliensis*.** Ratones BALB/c (5 ratones por grupo) fueron vacunados con  $1 \times 10^7$  promastigotes de *LiΔhsp70-II* o inoculados con PBS (Control) por vía s.c. en la almohadilla plantar. Los animales se infectaron 15 semanas después con  $1 \times 10^5$  promastigotes en fase estacionaria de *L. braziliensis* en la dermis de la oreja. El seguimiento semanal de la infección se realizó mediante la medición del grosor de la oreja en la zona infectada (A). Los animales se sacrificaron 5 o 10 semanas postinfección (spi) y se determinó el número de parásitos en los ganglios submaxilares drenantes del sitio de infección y en el bazo mediante dilución límite (B). Se representa la media y la desviación estándar del tamaño de la lesión y el número de parásitos de cada animal además de la media y la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y el control fueron determinadas con la prueba *t* de Student y se indican con \* ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

La lucha contra las enfermedades tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases* o NTDs), entre las que destaca la leishmaniosis, forma parte de uno de los Objetivos de Desarrollo del Milenio propuestos por Naciones Unidas (Hotez et al., 2016). En los últimos años, se han redoblado los esfuerzos encaminados a la eliminación de la leishmaniosis, estableciendo programas de vigilancia y de control del vector, así como desarrollando nuevos tratamientos y facilitando la distribución de los fármacos (WHO, 2010, WHO, 2015b, WHO, 2015a). Si bien, la administración de la mayoría de tratamientos farmacológicos es complicada al ser por vía parenteral y requiere del desplazamiento de los pacientes a centros de salud, lo que a menudo provoca que no llegue a completarse el tratamiento. Además, los tratamientos con frecuencia producen efectos secundarios adversos, y su empleo por largos periodos de tiempo está generando un serio problema de selección de cepas resistentes (Dumetz et al., 2017, Hefnawy et al., 2017, Ponte-Sucre et al., 2012). Aun habiéndose realizado importantes avances, como por ejemplo en la reducción de la incidencia en la India, existe un gran riesgo de reaparición de epidemias debido, en parte, a la existencia de individuos asintomáticos que pueden servir de reservorio para la transmisión del parásito (Engwerda and Matlashewski, 2015). Por ello, además de mantener los programas de control del vector y la investigación de nuevos tratamientos, el desarrollo de una vacuna efectiva contra la leishmaniosis es un objetivo prioritario, como la mejor opción para frenar su expansión y paliar el efecto socioeconómico de la enfermedad (Okwor and Uzonna, 2016, Mutiso et al., 2013, Modabber, 2010, Srivastava et al., 2016).

La inmunidad a la reinfección observada en individuos curados de la enfermedad indica que el desarrollo de una vacuna es posible, pero hasta la fecha no se ha logrado una vacuna eficaz para la leishmaniosis humana. En parte, la dificultad para alcanzar este objetivo se encuentra en la capacidad de este parásito por producir un estado de infección crónica, en el que el patógeno es capaz de suprimir o manipular la respuesta inmunitaria del hospedador para persistir en el organismo (Cecilio et al., 2014, Geiger et al., 2016). Hasta ahora, la única forma de vacunación que se ha mostrado efectiva en humanos es la leishmanización, que consiste en la inoculación de parásitos de la especie *L. major* en zonas ocultas de la piel. Tras la infección, se desarrolla una respuesta inflamatoria autolimitada en la zona de inoculación, pero que produce una inmunidad sistémica capaz de impedir la multiplicación del parásito tras infecciones posteriores. Esta estrategia fue utilizada durante gran parte del siglo XX para el control de la leishmaniosis cutánea en zonas de elevada endemidad como Israel, Irán o Uzbekistán (Nadim, 1997, Modabber, 1989, Noazin et al., 2008). Sin embargo, casos de reactivación y desarrollo de patología cutánea asociados con problemas de inmunosupresión, tales como la coinfección con el virus VIH o el uso de fármacos inmunosupresores, ha provocado su abandono (Khamesipour et al., 2006, Khamesipour et al., 2012).

El problema de bioseguridad que plantea la leishmanización podría ser evitado con el uso de vacunas atenuadas de *Leishmania*, capaces de generar inmunidad, pero incapaces de causar patología. Así, en los últimos años, se viene investigando la utilidad de cepas genéticamente atenuadas como una estrategia alternativa a la leishmanización (Dey, 2014, Saljoughian et al., 2014), que además está apoyada por los buenos resultados obtenidos utilizando vacunas atenuadas contra malaria (Kumar et al., 2016, Khan et al., 2012, Kreutzfeld et al., 2017, Singer and Frischknecht, 2017, Ishizuka et al., 2016, Seder et al., 2013) y otros patógenos (Zhang et al., 2016, Stinson et al., 2016, Russell and Halstead, 2016, Larsen et al., 2009, Luring et al., 2010).

En este trabajo se han analizado las propiedades profilácticas de una vacuna basada en una línea defectiva de la especie *L. infantum* que carece de uno de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 (*LiΔhsp70-II*). Este gen está implicado en la supervivencia del parásito cuando es sometido al aumento de temperatura que ocurre durante la transmisión desde el insecto vector al hospedador mamífero (Folgueira et al., 2008). Datos previos del grupo habían mostrado que la inoculación por vía i.v. de esta cepa en ratones BALB/c era capaz de conferir una protección a corto plazo frente a la infección con *L. major* (Carrion et al., 2011, Calvo-Alvarez et al., 2012). El objetivo de esta Tesis Doctoral se centró en estudiar diversos parámetros inmunológicos asociados a la capacidad inmunoproláctica de la línea genéticamente atenuada *LiΔhsp70-II* frente a la infección por diversas especies de *Leishmania* y en dos modelos de ratón.

Los análisis realizados en etapas tempranas de la infección indican que la protección que confiere la vacuna *LiΔhsp70-II* se basa en la generación de una respuesta inmunitaria capaz de inducir una rápida respuesta mediada por linfocitos productores de IFN- $\gamma$  tras la infección con las especies patogénicas. Tanto en la oreja y los ganglios submaxilares de los ratones C57BL/6 vacunados con *LiΔhsp70-II* e infectados con *L. major*, como en el bazo de los ratones BALB/c vacunados e infectados con *L. infantum*, se observó 72 h después de la infección una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (Figura 4.13 y 4.20, respectivamente). Está descrito que la migración rápida de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  al lugar de la reinfección es el mecanismo responsable de la inmunidad concomitante que han generado los animales curados de una primera infección, y es común para la protección frente a la leishmaniosis tanto cutánea como visceral (Ribeiro-Gomes et al., 2014, Peters et al., 2014, Romano et al., 2015, Pagan et al., 2013). Estas células, que son rápidamente reclutadas al sitio de infección corresponden con linfocitos T efectoros (T<sub>EFF</sub>) y no células de memoria (T<sub>CM</sub>), que necesitan más tiempo para migrar, proliferar y generar la respuesta protectora (Peters et al., 2014, Romano et al., 2015). Sin embargo, existe una población de linfocitos T residentes de memoria (T<sub>RM</sub>) que permanece en los tejidos y mantiene la capacidad de producir IFN- $\gamma$  de manera antígeno-específica (Glennie and Scott, 2016). Aunque, aparentemente, los T<sub>RM</sub> no son estrictamente

necesarios para generar la protección (Romano et al., 2015), sí que pueden tener un papel relevante en la resistencia a la reinfección (Glennie et al., 2017, Glennie et al., 2015). Por otro lado, el hecho de que los ratones vacunados sean capaces de inducir tras la infección una respuesta de IFN- $\gamma$  mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> es remarcable, pues se ha descrito que parte de la patología causada por la infección con *L. major* se debe a que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentes en la piel y el ganglio drenante no son productores de IFN- $\gamma$  (Novais et al., 2018).

La respuesta generada por la vacunación puede explicar la protección observada en los diferentes modelos empleados, actuando a diferentes niveles. En los ratones C57BL/6 infectados por *L. major* se ha demostrado la anticipación de la respuesta proinflamatoria en el sitio de infección. Este mecanismo de protección conduce a una inhibición de la multiplicación del parásito y, como consecuencia, a la ausencia de lesiones inflamatorias características del modelo, donde tras un periodo silencioso (de multiplicación parasitaria) se genera una fuerte respuesta inflamatoria que disminuye la carga parasitaria pero genera lesiones cutáneas (Belkaid et al., 2000). En el caso del modelo susceptible (BALB/c - *L. major*), junto a la generación de respuestas mediadas por IFN- $\gamma$ , cabe destacar un control en la producción de IL-10 e IL-4 en los animales vacunados con *Li $\Delta$ hsp70-II*. El control de la respuesta de estas citocinas puede ser suficiente para frenar las manifestaciones patológicas en este modelo; un proceso similar se ha descrito tras la vacunación con una cepa atenuada de *L. major* que no sintetiza fosfoglicanos debido a la eliminación de un gen que codifica para un transportador de GDP-manosa *Lmplpg2*<sup>-</sup> (Uzonna et al., 2004b). Buscando un paralelismo entre los datos de protección obtenidos con la cepa *Li $\Delta$ hsp70-II* y los descritos para otras vacunas en ambos modelos (Ramirez et al., 2014, Santos et al., 2013, Carneiro et al., 2012, Chavez-Fumagalli et al., 2010), se podría establecer la hipótesis de que la protección se asocia a ambos procesos: producción de IFN- $\gamma$  de forma temprana tras la infección y control de las respuestas mediadas por IL-10 e IL-4. En relación con la protección generada en el modelo visceral, no sólo se anticipa la respuesta de IFN- $\gamma$ , sino que en los animales vacunados se produce una respuesta con una relación IFN- $\gamma$ /IL-10 más alta que en los controles tras la infección con la cepa viscerotrópica, de la misma forma que se observa en animales inmunizados con otras vacunas que protegen de la infección con *L. donovani* (Selvapandiyan et al., 2009, Anand and Madhubala, 2015, Saini et al., 2018, Dey et al., 2013). Además, la respuesta temprana observada en el bazo de los animales vacunados puede ser responsable de una formación y activación anticipada de los granulomas hepáticos, lo que explicaría la rápida curación que se ha observado en este órgano (Moore et al., 2016, Kedzierski and Evans, 2014, Stanley and Engwerda, 2007). Para comprobar si esto es lo que está ocurriendo en animales vacunados con *Li $\Delta$ hsp70-II*, sería conveniente estudiar en el futuro la respuesta inmunitaria generada en el hígado, así como la histología del bazo y el hígado (Rodrigues et al., 2016a, Carrion et al., 2006).

Como parte fundamental de la respuesta inmunitaria, se estudió también la dinámica de las poblaciones de células dendríticas en el bazo durante las primeras etapas de la infección con *L. infantum*. Se pudieron identificar los principales tipos de células dendríticas, aunque se necesitaría realizar un marcaje más específico si se quisiera profundizar en su estudio (Ashok and Acha-Orbea, 2014). En los ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* se observó, 72 h después de la infección, un incremento en el porcentaje de células dendríticas convencionales (cDC). Las cDC CD11b<sup>+</sup> se asocian en tejidos linfoides con la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la migración desde la zona marginal del bazo a las zonas ricas en linfocitos T (Ardavin, 2003), mientras que las cDC CD11b<sup>-</sup> producen IL-12 y están especializadas en la presentación de antígenos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Hey and O'Neill, 2012, Wilson and O'Neill, 2003, den Haan et al., 2000). El aumento de estos tipos celulares sugiere que en el bazo de los ratones vacunados está ocurriendo un incremento de la presentación antigénica a linfocitos T, con respecto a los animales no vacunados. También se observó un aumento en el porcentaje de células dendríticas no convencionales, plasmacitoides (pDC) y derivadas de monocitos (moDC). Las pDC producen IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  en respuesta a *L. infantum* (Schleicher et al., 2007, Feijo et al., 2016); estos interferones se han asociado con la actividad leishmanicida en macrófagos infectados por *L. donovani* (Phillips et al., 2010). En cuanto a las moDC, el marcaje con el que se han clasificado en este trabajo (MHC-II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>) sugiere que podrían tratarse de células dendríticas inflamatorias o T1P-DCs (De Trez et al., 2009), un tipo de moDC productoras de TNF y NO (Schmid et al., 2012, Feijo et al., 2016) que son reclutados en procesos inflamatorios al bazo y los ganglios linfáticos (Geissmann et al., 2008).

Una de las características más destacables de la vacuna *LiΔhsp70-II* es la duración de la inmunidad que genera. Existen numerosas evidencias que sugieren que para mantener una respuesta protectora a largo plazo es necesaria la persistencia del antígeno (Sacks, 2014). Así, la limitación más importante de las vacunas de subunidades es que no son capaces de conferir inmunidad a largo plazo, si no se inoculan periódicamente dosis de recuerdo (Okwor et al., 2012). Esto es debido a que cuando el estímulo desaparece la protección depende únicamente de la respuesta que generan los linfocitos T de memoria, que es más lenta e insuficiente para controlar eficazmente la infección (Scott et al., 2004, Okwor and Uzonna, 2008, Opata and Stephens, 2013, Glennie and Scott, 2016). Por el contrario, la respuesta que produce la infección natural o la leishmanización, es una combinación de las respuestas efectora y de memoria frente al repertorio completo de antígenos del parásito y, al igual que ocurre con otras infecciones parasitarias (Stephens and Langhorne, 2010, Brown and Grenfell, 2001, Struik and Riley, 2004, Rajakumar et al., 2006), la persistencia de los parásitos en el hospedador asegura el mantenimiento de la población de linfocitos T<sub>EFF</sub>, responsable de la inmunidad concomitante (Peters et al., 2014, Sacks, 2014). En este sentido, la eliminación total de los parásitos

que persisten en los individuos curados de la enfermedad causa la pérdida de protección a la reinfección (Okwor and Uzonna, 2008). Por todo ello, las vacunas atenuadas, que se caracterizan por su persistencia en el organismo, al menos durante cierto tiempo, tienen un gran potencial para generar respuestas inmunitarias duraderas; si bien, hasta ahora, solo unas pocas han sido ensayadas en su capacidad de generar inmunidad a largo plazo (Tabla 1.3). Si la persistencia de los parásitos atenuados condiciona una mayor o menor duración de la inmunidad es un asunto relevante en el que merece seguir profundizándose.

Si bien la vacunación con la cepa *LiΔhsp70-II*, tanto por vía i.v. como por vía s.c., confiere una protección duradera y similar frente a la infección con *L. major*, la distribución y persistencia de los parásitos es distinta. Por un lado, la vía i.v. de inoculación produce una infección sistémica, que es detectada en el bazo, el hígado y la médula ósea, pero que desaparece entre 4 y 16 semanas después de la vacunación. Esta progresión de los parásitos es similar a la observada con otras vacunas atenuadas, administradas por vía i.v. o i.p., tales como las basadas en líneas mutantes de *L. donovani* como *LdCen*<sup>-/-</sup>, que carece del gen que codifica para la centrina (Selvapandiyan et al., 2001, Selvapandiyan et al., 2009), *Ldp27*<sup>-/-</sup>, que carece de una proteína que forma parte del complejo citocromo oxidasa c (Dey et al., 2013), el mutante de delección para un transportador de biopterina (*LdBT1*<sup>-/-</sup>) (Papadopoulou et al., 2002), la línea deficiente para la enzima arabino-1,4-lactona oxidasa (*LdΔALO*) (Anand and Madhubala, 2015), y una cepa que carece del gen que codifica la fructosa-1,6-bifosfatasa (*LdΔFbpase*) (Saini et al., 2018). Por otro lado, la inoculación de *LiΔhsp70-II* por vía s.c., produce una infección localizada en el sitio de infección y el ganglio drenante, pero que aparentemente no progresa hacia las vísceras, y resulta en la persistencia continuada de un pequeño número de parásitos en el ganglio drenante. Este hecho también ha sido observado tras la inoculación s.c. con otras cepas como *Lmlpg2*<sup>-</sup> (Uzonna et al., 2004b) o *Lmdhfr-ts*<sup>-/-</sup>, auxotrófica debido a la eliminación del gen de la dihidrofolato reductasa timidilato sintasa (Titus et al., 1995). Asimismo, la inoculación i.d. de *LdCen*<sup>-/-</sup> junto con la proteína LMJ19, que forma parte de la saliva del flebótomo, en hámster confiere una protección equivalente a la de la vacunación i.c., y conlleva la persistencia de los parásitos atenuados en el lugar de la infección y el ganglio drenante, mientras que son indetectables en los órganos internos (Fiuza et al., 2016).

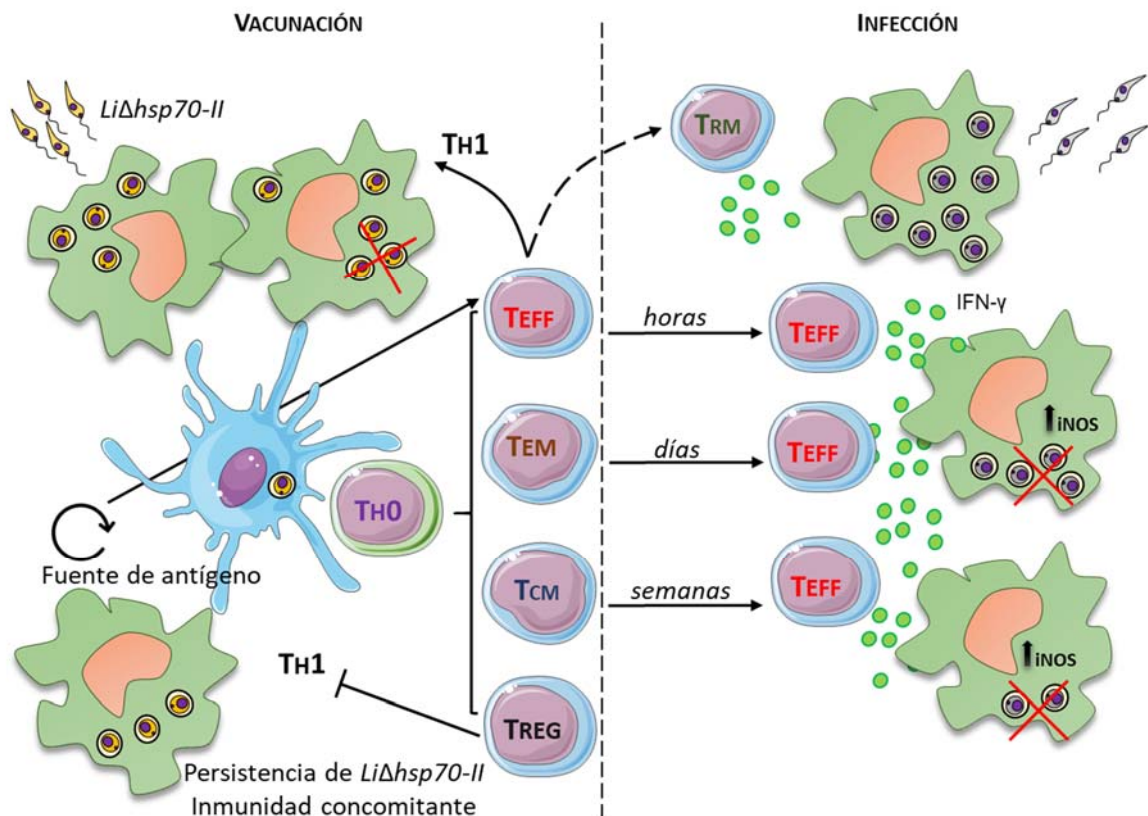
Volviendo a la administración de cepas atenuadas por vía intravenosa, al igual que se ha observado con la línea *LiΔhsp70-II*, resulta llamativo que pocas semanas tras la vacunación no se detecten los parásitos en el organismo pero se mantenga una inmunidad protectora a largo plazo; este hecho también ha sido documentado con las vacunas atenuadas *LdCen*<sup>-/-</sup>, *Ldp27*<sup>-/-</sup>, *LdΔALO* o *LdΔFbpase* (Selvapandiyan et al., 2009, Dey et al., 2013, Anand and Madhubala, 2015, Saini et al., 2018). Una posible explicación es que aún permanezca una población de linfocitos T<sub>EFF</sub> suficiente como para mantener el mismo grado de inmunidad, aunque en ese caso cabe pensar que esta inmunidad no



se mantenga indefinidamente. Otra posibilidad es que algunos parásitos puedan persistir en localizaciones no conocidas del organismo tras la inoculación i.v., pero de forma indetectable debido a su bajo número y probable dispersión en varios tejidos del organismo; mientras que tras la vacunación s.c., los parásitos quedan restringidos al ganglio drenante, y aun estando en un bajo número, son más fácilmente detectables dado el pequeño tamaño de la muestra biológica. En este sentido, cabe destacar un trabajo reciente en el que se ha documentado la existencia de una población de parásitos persistentes que no se replican de forma activa, o que lo hacen muy lentamente, y que tienen un papel relevante en el mantenimiento de la inmunidad concomitante (Mandell and Beverley, 2017). Aun así, no puede descartarse que la protección a largo plazo que confieren estas vacunas se produzca en una ausencia total parásitos, debido a la acción de linfocitos T de memoria efectora (TEM) o TRM (Glennie et al., 2015, Schenkel and Masopust, 2014, Restifo and Gattinoni, 2013, Colpitts et al., 2009).

Los resultados mostrados en esta Tesis, junto a datos de la literatura científica, permiten proponer un modelo (Figura 5.1) sobre el mecanismo inmunológico responsable de la protección generada tras la vacunación con la línea *LiΔhsp70-II*. Este modelo se basa en que la administración de la vacuna atenuada produce una infección autolimitada, que no causa patología, pero que es suficiente para generar una respuesta inmunitaria efectora y de memoria frente al conjunto de antígenos del parásito. La respuesta efectora se mantiene de forma indefinida debido a la persistencia de una pequeña población de parásitos que no son eliminados y que actúan como una fuente de antígeno que se mantiene de forma autónoma, estimulando células dendríticas, que, a su vez, serían las responsables de promover la diferenciación de nuevos linfocitos TEFF, responsables de la inmunidad concomitante. Aunque aún no se ha estudiado en este modelo, es probable que el mantenimiento de los parásitos se deba a la acción de células reguladoras, como linfocitos TREG, que impidan su desaparición (Peters and Sacks, 2006).

Cuando el individuo vacunado resulta infectado con parásitos virulentos de diversas especies de *Leishmania*, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> son reclutados rápidamente al lugar de infección, donde producen IFN-γ de forma específica y activan a los macrófagos infectados para controlar la multiplicación de los parásitos. Esta respuesta, que es producida por los linfocitos TEFF preexistentes a la infección, se anticipa a la que ocurre en los individuos no vacunados, en los que es necesario desarrollar la respuesta adaptativa en los tejidos linfoides. Aunque aún no se ha analizado, seguramente exista también una población de células TRM que participan en la producción de IFN-γ frente al parásito. Posteriormente, los linfocitos T de memoria contribuyen a reforzar la respuesta TEFF días o semanas después de la infección, en función de sus capacidades migratorias y su estado de diferenciación (TCM, TEM).



**Figura 5.1. Modelo de protección de la vacuna *LiΔhsp70-II*.** Se muestra la respuesta inmunitaria generada por la vacunación con los parásitos atenuados y la protección asociada a la persistencia de un pequeño número de parásitos, que mantienen activa a la inmunidad concomitante. TEFF: linfocitos T efectores. TEM: linfocitos T efectores de memoria. TCM: linfocitos T de memoria central. TREG: linfocitos T reguladores.

Posiblemente, en el modelo propuesto, intervengan otros tipos celulares, como, por ejemplo, las células TH17, un linaje de linfocitos T cuya implicación en la infección por *Leishmania* y en la respuesta protectora generada por vacunas atenuadas está siendo analizada actualmente (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017, Banerjee et al., 2017, Banerjee et al., 2016). Además, convendría profundizar en la caracterización fenotípica de las poblaciones de linfocitos T activadas por antígenos de *Leishmania*, para las que técnicas basadas en la utilización de tetrámeros marcados de MHC unidos a antígenos del parásito serían de gran ayuda (Pagan et al., 2013, Ismail et al., 2017).

Otra característica muy relevante de la vacuna *LiΔhsp70-II* es que el alto grado de protección también se alcance al hacer la inoculación por la vía s.c. Esta vía de inoculación no ha sido ensayada en profundidad en la mayoría de las vacunas genéticamente atenuadas descritas hasta el momento, especialmente si se trata de vacunas basadas en las especies viscerotrópicas *L. infantum* o *L. donovani* (Silvestre et al., 2007, Dey et al., 2013, Selvapandiyan et al., 2009, Anand and Madhubala, 2015). Existen algunos ejemplos en los que, curiosamente, los resultados no fueron prometedores. Así, la línea *Lmdhfr-ts<sup>-/-</sup>* que confiere protección contra *L. major* cuando se inocula por vía i.v. no lo hace al

ser administrada por vía s.c. (Titus et al., 1995). Por otra parte, la vacunación s.c. con *L. chagasi dhfr-ts<sup>-/-</sup>* no confiere protección frente a *L. chagasi* (Streit et al., 2001). También se ha descrito que la protección contra *L. mexicana* tras la vacunación i.p. con una línea de *L. mexicana* atenuada a la que se le ha eliminado el gen que codifica para la GDP-manosa pirofosforilasa (*LmΔGDP-MP*) no se genera cuando esta línea es administrada a través de la ruta s.c. (Stewart et al., 2005).

Tiene un valor muy significativo, no solo desde el punto de vista sanitario, sino también el económico (Okwor and Uzonna, 2016, Bacon et al., 2013), que una vacuna como *LiΔhsp70-II* sea capaz de proteger de forma duradera frente a distintas formas de leishmaniosis, tanto cutaneotrópicas (*L. major*, Viejo Mundo, y *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, Nuevo Mundo) como viscerotrópica (*L. infantum*). Así, la inoculación por vía s.c. de esta cepa atenuada es capaz de controlar la progresión de la patología provocada por la infección de *L. major* (tanto en el modelo susceptible BALB/c (Gumy et al., 2004) como en el modelo resistente C57BL/6 (Belkaid et al., 2000)), así como la causada por *L. braziliensis* (de Moura et al., 2005) y *L. amazonensis* (Courret et al., 2003). La protección observada es similar (aunque de mayor duración) a la conseguida por algunas vacunas basadas en antígenos definidos (Mou et al., 2015, Iborra et al., 2005, Ramirez et al., 2013, Duthie et al., 2017). En el caso de animales infectados con *L. infantum* (BALB/c), la vacunación provocó una menor carga parasitaria en bazo e hígado, un grado de protección similar al que se ha descrito en animales inmunizados por una infección subclínica anterior (Bruhn et al., 2012, Streit et al., 2001, Romano et al., 2015, McCall et al., 2013). Debido a que las leishmaniosis están causadas por diferentes especies y muestran distintas formas clínicas (Gollob et al., 2014), parece complicado desarrollar una vacuna capaz de inducir protección frente a la patología causada por diferentes especies del parásito (Tabla 1.1) (Soong et al., 2012). A pesar de ello, la enorme cantidad de antígenos que comparten las distintas especies y los numerosos trabajos que evidencian la existencia de mecanismos de protección cruzada (Porrozzi et al., 2004, Tonui and Titus, 2007, Romano et al., 2015, Goto et al., 2009, Dey et al., 2014, Ramirez et al., 2014, Mou et al., 2015) sugieren que el desarrollo de una vacuna universal contra *Leishmania* es posible. Las vacunas atenuadas ensayadas en ratón suelen proteger frente a la infección con la misma especie de *Leishmania*, aunque su eficacia para el control de la patología tras la infección por otras especies del parásito es variable. Por ejemplo, la línea *L. major dhfr-ts<sup>-/-</sup>* es capaz de inducir protección frente a *L. major* (Titus et al., 1995) pero no frente a *L. chagasi* (Streit et al., 2001). De la misma forma, la inoculación de *L. chagasi dhfr* no protege de la infección heteróloga con *L. major* (Streit et al., 2001). La cepa *Lmlpg2<sup>-</sup>* confiere protección contra la infección homóloga pero no frente a *L. mexicana* (Uzonna et al., 2004b), y *LdCen<sup>-/-</sup>* induce una protección robusta frente la infección con *L. donovani*, aunque más limitada contra la infección por *L. mexicana* y *L. major* (Selvapandiyar et al., 2009, Dey et al., 2014). Sin embargo, *Ldp27<sup>-/-</sup>* protege de forma eficaz frente a la infección con *L. donovani*, *L. major* y *L. braziliensis* (Dey et al., 2013).

Aunque las vacunas basadas en parásitos atenuados se han mostrado en ensayos pre-clínicos como las más efectivas, una de las preocupaciones que suscita su uso está relacionada con la bioseguridad (Gannavaram et al., 2016, Gannavaram et al., 2014). En primer lugar, los parásitos deben estar genéticamente definidos. Es un requisito que el parásito tenga inutilizados ambos alelos del gen, pues mutantes parciales que conservan inalterado uno de los alelos pueden recuperar, durante su multiplicación *in vivo* o *in vitro*, sus características genéticas originales y con ello su virulencia. También es importante estudiar la estabilidad del fenotipo defectivo en virulencia a través de varios pases por animales; en ocasiones se ha constatado la recuperación del fenotipo de virulencia como consecuencia de la sobreexpresión de otro gen (mecanismos compensatorios) (Spath et al., 2004). Además, es conveniente conocer el genoma de la cepa vacunal para determinar el posible efecto de la mutación en otros genes (Chhajer and Ali, 2014, Gannavaram et al., 2017). Por otro lado, aunque la presencia de los marcadores NEO e HYG en preparados terapéuticos está aceptada en ensayos clínicos (Gannavaram et al., 2014), es recomendable eliminar los genes de resistencia a antibióticos para comercializar vacunas genéticamente atenuadas de uso humano (Denise et al., 2004, Mureev et al., 2007) y así evitar posibles problemas de resistencia cruzada a fármacos antimicrobianos (Gueiros-Filho and Beverley, 1994, Chhajer and Ali, 2014).

Por otro lado, también es importante establecer si en estados de inmunosupresión las vacunas atenuadas podrían generar procesos patológicos. En el caso de la vacuna *LiΔhsp70-II*, la infección es autolimitante y no induce patología en ratones inmunodeficientes SCID, ni tampoco en un modelo animal altamente susceptible para *L. infantum* como es el hámster (Carrion et al., 2011). Sin embargo, sería conveniente analizar el efecto de una inmunosupresión farmacológica, por ejemplo con dexametasona, en animales vacunados. En este sentido, cabe indicar que la vacuna atenuada *LdCen*<sup>-/-</sup> tampoco produce patología en ratones SCID ni en hámster (Selvapandiyan et al., 2009); y, por otro lado, el tratamiento inmunosupresor con dexametasona en ratones BALB/c no produce la reactivación de la infección con la vacuna atenuada *Ldp27*<sup>-/-</sup> (Dey et al., 2013). Incluso se ha determinado que las propiedades atenuadas de *LdCen*<sup>-/-</sup> y *Ldp27*<sup>-/-</sup> tampoco dependen de la generación de una respuesta innata, pues su seguridad se mantiene aun bloqueando esta respuesta en BMDDCs infectadas (Dey et al., 2014). En cambio, este nivel de atenuación no lo presentan otras vacunas atenuadas. Así, la vacuna *L. mexicana Δcpa/cpb*, que carece de dos genes que codifican para cisteín-proteasas, produce en hámster una infección persistente, que termina generando patología (Saravia et al., 2006). Asimismo, una cepa atenuada de *L. infantum* a la que se ha eliminado uno de los alelos del gen que codifica para la sirtuina (*LiSIR2*<sup>+/-</sup>), genera en ratones SCID una infección persistente (Silvestre et al., 2007). Finalmente, cabe mencionar una estrategia diseñada para mejorar la bioseguridad de las vacunas atenuadas, que consiste en la introducción del gen timidina cinasa en el genoma del parásito, lo que

los hace vulnerables al tratamiento con el antiviral aciclovir (Muyombwe et al., 1997, Davoudi et al., 2014).

Durante las campañas de leishmanización, se detectó en niños una menor respuesta inmunitaria a la vacuna DPT (difteria, pertussis y tétanos) (Noazin et al., 2008), por lo que habría que evaluar si la vacuna puede inducir un estado de inmunosupresión general en el hospedador.

También hay que tener en cuenta el efecto inmunomodulador ejercido por algunos de los componentes de la saliva del vector, que son inoculados junto con los parásitos en el lugar de la picadura (Abdeladhim et al., 2014, Dey et al., 2018). Dado que la leishmanización funciona de forma eficaz, se piensa que las vacunas vivas son capaces de generar una respuesta inmunitaria que no resulta afectada por la inmunomodulación ejercida por componentes de la saliva (Khamesipour et al., 2005, Peters et al., 2009). Además, el mecanismo de protección basado en una respuesta rápida a la reinfección se ha mostrado activo incluso en infecciones naturales a través de la picadura del vector (Peters et al., 2014, Peters et al., 2009). De todas formas, sería interesante comprobar la capacidad profiláctica de la línea *LiΔhsp70-II* frente a la infección natural con flebótomos o, alternativamente, frente a la infección con el parásito en presencia de las proteínas de la saliva (Fiuza et al., 2016).

Una característica deseable para una vacuna atenuada es que no pueda multiplicarse en el insecto vector o completar el ciclo (Secundino et al., 2010). El parásito no debería ser capaz de sobrevivir o diferenciarse en el flebótomo, ya que podría diseminar el parásito de forma descontrolada en la naturaleza y, además, se ha descrito que, en condiciones de laboratorio y seguramente en la naturaleza, distintas cepas de *Leishmania* pueden experimentar procesos de fusión celular en el intestino del vector, generándose cepas híbridas (Rogers et al., 2014, Akopyants et al., 2009, Calvo-Alvarez et al., 2014). En este contexto, sería muy interesante realizar estudios con la cepa *LiΔhsp70-II* para evaluar su capacidad de multiplicarse en el insecto vector y si es capaz de desarrollarse en él. Estos estudios ya han sido realizados con las vacunas atenuadas *LdCen*<sup>-/-</sup> y *Ldp27*<sup>-/-</sup>, y se ha visto que no son capaces de establecerse en el flebótomo (Gannavaram et al., 2014).

Otro aspecto relevante a considerar en cuanto al uso de las vacunas atenuadas es si la dinámica de multiplicación de los parásitos de la vacuna puede verse influenciada por una infección con una cepa virulenta. Este es una cuestión a tener en cuenta, no sólo por la bioseguridad de la vacuna sino también porque la persistencia de los parásitos atenuados responsables de mantener la inmunidad concomitante no impide la colonización por otras cepas de *Leishmania* más virulentas, aunque sí limita su patología (Mandell and Beverley, 2016). Así, es posible que una infección pueda desplazar los parásitos atenuados de una vacuna y que los nuevos parásitos formen parte o sustituyan la inmunidad concomitante existente. En ese caso, puede ocurrir que la sustitución de la población de parásitos original, que es segura, por parásitos virulentos, puede generar los mismos problemas que existen en individuos curados si estos sufren posteriormente una inmunosupresión. En los estudios realizados

con la vacuna *LiΔhsp70-II*, se ha constatado que la población de parásitos atenuados no resulta afectada por la infección con cepas virulentas de *L. major* u otras especies, ni se activó su multiplicación ni se aceleró su desaparición.

Además de la bioseguridad, otro reto importante que las vacunas atenuadas tienen que solventar está relacionado con aspectos logísticos, en cuanto a su estandarización y distribución. Por un lado, hay que asegurar que en todas las dosis las propiedades inmunogénicas sean las mismas. Los ensayos de leishmanización cesaron en Israel debido a una pérdida de infectividad de los parásitos como consecuencia del cultivo prolongado, mientras que en Irán se abandonó después de observar en algunos casos una patología más grave de la esperada debida a la vacunación (Noazin et al., 2008). La utilización de parásitos genéticamente atenuados asegura la inoculación de una vacuna genéticamente definida, pero sería indispensable conocer el genoma y el transcriptoma de cada lote producido, así como el perfil proteómico, como método de identificación y control. Por otro lado, para trabajar en condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP), es necesario establecer un medio de cultivo definido que evite el uso de suero (Nayak et al., 2018). Por ello, sería muy conveniente estudiar la capacidad de multiplicación de la cepa *LiΔhsp70-II* en este tipo de medios (McCarthy-Burke et al., 1991), en los que sí se ha demostrado el crecimiento de las cepas atenuadas *LdCen<sup>-/-</sup>* y *Ldp27<sup>-/-</sup>* (Dey, 2014). En cuanto a la distribución, aunque se podrían seguir los protocolos establecidos en las campañas de leishmanización, sería interesante aprovechar el conocimiento generado en la estandarización de los procedimientos empleados en la distribución de la vacuna atenuada PfSPZ contra malaria, distribuida por Sanaria® y que está siendo empleada en ensayos clínicos (Hoffman et al., 2010, Ishizuka et al., 2016, Lyke et al., 2017, Sissoko et al., 2017). Por otro lado, sería una gran ventaja poder disponer de un método de distribución que no requiera de cadenas de frío o de la criopreservación, lo que reduciría en gran medida los costes y facilitaría su distribución y aplicación en los lugares donde las leishmaniosis son endémicas.



## CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

1. La inoculación por vía intravenosa de la línea genéticamente atenuada *LiΔhsp70-II* produce en ratones BALB/c una infección autolimitante en el bazo, hígado y médula ósea, mientras que la inoculación subcutánea en ratones BALB/c y C57BL/6 conduce a la persistencia de un número muy bajo de parásitos en el ganglio linfático drenante del sitio de inoculación, pero sin causar patología.
2. La vacunación de ratones BALB/c por vía intravenosa o subcutánea con la línea *LiΔhsp70-II* confiere protección, a corto y largo plazo, frente a la infección por *L. major*. La respuesta inmunitaria generada, mayormente con características de respuesta TH1, restringe la multiplicación del inóculo infeccioso y evita la aparición de la lesión cutánea.
3. Los ratones C57BL/6 vacunados por vía subcutánea con la línea *LiΔhsp70-II* quedan protegidos a largo plazo frente a la infección con *L. major*. Los animales anticipan una respuesta TH1 moderada, que es suficiente para controlar la infección sin producir una lesión inflamatoria.
4. La vacunación por vía subcutánea de ratones BALB/c con la línea *LiΔhsp70-II* confiere protección duradera frente a la infección con *L. infantum*. En los animales vacunados se produce un control de la carga parasitaria en el hígado que conduce a una rápida eliminación de los parásitos en este órgano. Además, en el bazo, se promueve una respuesta adaptativa celular que responde a la presencia del patógeno con la producción de una mayor relación IFN- $\gamma$ /IL-10.
5. La vacuna *LiΔhsp70-II* administrada por vía subcutánea confiere protección duradera frente a la infección con *L. amazonensis* o con *L. braziliensis* en ratones BALB/c, en los cuales se produce un control de la carga parasitaria y no se desarrollan lesiones cutáneas.
6. La protección inducida por la vacuna *LiΔhsp70-II* es debida a una rápida inducción de la respuesta celular mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , que son reclutados al sitio de infección y promueven la destrucción de los parásitos. Esta protección se mantiene en el tiempo por la persistencia de un pequeño número de parásitos de la vacuna, que van a ser blanco de las células presentadoras encargadas de mantener la respuesta efectora.
7. La infección con un inóculo virulento de los animales vacunados no produce un cambio en las características de atenuación de la línea *LiΔhsp70-II*, un aspecto de bioseguridad muy importante que debe cumplir una vacuna atenuada.



## BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abanades, D. R., Arruda, L. V., Arruda, E. S., Pinto, J. R., Palma, M. S., Aquino, D., Caldas, A. J., Soto, M., Barral, A. & Barral-Netto, M. 2012. Immunodominant antigens of *Leishmania chagasi* associated with protection against human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1687.
- Abdeladhim, M., Kamhawi, S. & Valenzuela, J. G. 2014. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol*, 28, 691-703.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votypka, J., Marty, P., Delaunay, P. & Sereno, D. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004349.
- Akopyants, N. S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D. E., Beverley, S. M. & Sacks, D. L. 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 324, 265-268.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Garcia-Tabares, F., Mena, M. C., Ciordia, S. & Larraga, V. 2016. Increased abundance of proteins involved in resistance to oxidative and nitrosative stress at the last stages of growth and development of *Leishmania amazonensis* promastigotes revealed by proteome analysis. *PLoS One*, 11, e0164344.
- Alexander, J. & Brombacher, F. 2012. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Front Immunol*, 3, 80.
- Alexander, J., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol*, 161, 6794-6801.
- Aliaga, L., Cobo, F., Mediavilla, J. D., Bravo, J., Osuna, A., Amador, J. M., Martin-Sanchez, J., Cordero, E. & Navarro, J. M. 2003. Localized mucosal *Leishmaniasis* due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: Clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*, 82, 147-158.
- Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S. & Reed, S. G. 2013. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 31 Suppl 2, B244-249.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. & Den Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671.
- Alvar, J., Yactayo, S. & Bern, C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22, 552-557.
- Anand, S. & Madhubala, R. 2015. Genetically engineered ascorbic acid-deficient live mutants of *Leishmania donovani* induce long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *Sci Rep*, 5, 10706.
- Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. & Sacks, D. 2007. CD4(+)CD25(-)foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 204, 285-297.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., Garcia, N., Moratilla, L., De La Fuente, S., Martinez, A. M., Perez, A. M., Aranguiz, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J. & Vilas, F. 2013. Re-emergence

- of leishmaniasis in Spain: Community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*, 18, 20546.
- Ardavin, C.** 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 3, 582-590.
- Ashford, R. W.** 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*, 14, 523-532.
- Ashford, R. W.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30, 1269-1281.
- Ashford, R. W.** 2001. Current usage of nomenclature for parasitic diseases, with special reference to those involving arthropods. *Med Vet Entomol*, 15, 121-125.
- Ashok, D. & Acha-Orbea, H.** 2014. Timing is everything: Dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends Parasitol*, 30, 499-507.
- Askarizadeh, A., Jaafari, M. R., Khamesipour, A. & Badiee, A.** 2017. Liposomal adjuvant development for leishmaniasis vaccines. *Ther Adv Vaccines*, 5, 85-101.
- Ato, M., Maroof, A., Zubairi, S., Nakano, H., Kakiuchi, T. & Kaye, P. M.** 2006. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol*, 176, 5486-5493.
- Avishek, K., Kaushal, H., Gannavaram, S., Dey, R., Selvapandiyan, A., Ramesh, V., Negi, N. S., Dubey, U. S., Nakhasi, H. L. & Salotra, P.** 2016. Gene deleted live attenuated *Leishmania* vaccine candidates against visceral leishmaniasis elicit pro-inflammatory cytokines response in human PBMCs. *Sci Rep*, 6, 33059.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro De Jesus, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J. & Carvalho, E. M.** 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*, 70, 6734-6740.
- Bacon, K. M., Hotez, P. J., Kruchten, S. D., Kamhawi, S., Bottazzi, M. E., Valenzuela, J. G. & Lee, B. Y.** 2013. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine*, 31, 480-486.
- Banerjee, A., Bhattacharya, P., Dagur, P. K., Karmakar, S., Ismail, N., Joshi, A. B., Akue, A. D., Kukuruga, M., McCoy, J. P., Jr., Dey, R. & Nakhasi, H. L.** 2017. Live attenuated *Leishmania donovani* centrin gene-deleted parasites induce IL-23-dependent IL-17-protective immune response against visceral leishmaniasis in a murine model. *J Immunol*.
- Banerjee, A., Bhattacharya, P., Joshi, A. B., Ismail, N., Dey, R. & Nakhasi, H. L.** 2016. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. *Cell Immunol*.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L.** 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends Parasitol*, 24, 324-330.
- Bañuls, A. L., Hide, M. & Prugnolle, F.** 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-109.

- Barhoumi, M., Garnaoui, A., Kaabi, B., Tanner, N. K. & Guizani, I. 2011. *Leishmania infantum* LeIF and its recombinant polypeptides modulate interleukin IL-12p70, IL-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  production by human monocytes. *Parasite Immunol*, 33, 583-588.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Junior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro De Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M. & Et Al. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, 44, 536-546.
- Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T. & Roy, S. 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: Evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 174, 7160-7171.
- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-1106.
- Bates, P. A., Depaquit, J., Galati, E. A., Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, M. A., Picado, A., Ready, P. D., Salomon, O. D., Shaw, J. J., Traub-Cseko, Y. M. & Warburg, A. 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasit Vectors*, 8, 131.
- Baylis, M. 2017. Potential impact of climate change on emerging vector-borne and other infections in the UK. *Environ Health*, 16, 112.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. & Sacks, D. 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*, 165, 969-977.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. & Sacks, D. L. 2002a. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420, 502-507.
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. & Sacks, D. 2002b. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol*, 168, 3992-4000.
- Bern, C., Maguire, J. H. & Alvar, J. 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e313.
- Bhaumik, S., Basu, R., Sen, S., Naskar, K. & Roy, S. 2009. KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. *Vaccine*, 27, 1306-1316.
- Blackwell, J. M., Fakiola, M., Ibrahim, M. E., Jamieson, S. E., Jeronimo, S. B., Miller, E. N., Mishra, A., Mohamed, H. S., Peacock, C. S., Raju, M., Sundar, S. & Wilson, M. E. 2009. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol*, 31, 254-266.
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D. M. 2011. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*, 10, 499-511.
- Borja-Cabrera, G. P., Cruz Mendes, A., Paraguai De Souza, E., Hashimoto Okada, L. Y., De, A. T. F. A., Kawasaki, J. K., Costa, A. C., Reis, A. B., Genaro, O., Batista, L. M., Palatnik, M. & Palatnik-



- De-Sousa, C. B.** 2004. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, 22, 2234-2243.
- Brown, S. P. & Grenfell, B. T.** 2001. An unlikely partnership: Parasites, concomitant immunity and host defence. *Proc Biol Sci*, 268, 2543-2549.
- Bruhn, K. W., Birnbaum, R., Haskell, J., Vanchinathan, V., Greger, S., Narayan, R., Chang, P. L., Tran, T. A., Hickerson, S. M., Beverley, S. M., Wilson, M. E. & Craft, N.** 2012. Killed but metabolically active *Leishmania infantum* as a novel whole-cell vaccine for visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 19, 490-498.
- Buffet, P. A., Sulahian, A., Garin, Y. J., Nassar, N. & Derouin, F.** 1995. Culture microtitration: A sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2167-2168.
- Burns, J. M., Jr., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R. & Reed, S. G.** 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 775-779.
- Calvo-Alvarez, E., Alvarez-Velilla, R., Jimenez, M., Molina, R., Perez-Pertejo, Y., Balana-Fouce, R. & Reguera, R. M.** 2014. First evidence of intraclonal genetic exchange in Trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3075.
- Calvo-Alvarez, E., Guerrero, N. A., Alvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Punzon, C., Llamas, M. A., Arevalo, F. J., Rivas, L., Fresno, M., Perez-Pertejo, Y., Balana-Fouce, R. & Reguera, R. M.** 2012. Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both in vitro and in vivo studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1927.
- Campos-Neto, A.** 2005. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res*, 38, 979-984.
- Carcelen, J., Iniesta, V., Fernandez-Cotrino, J., Serrano, F., Parejo, J. C., Corraliza, I., Gallardo-Soler, A., Maranon, F., Soto, M., Alonso, C. & Gomez-Nieto, C.** 2009. The chimerical multi-component Q protein from leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, 27, 5964-5973.
- Carneiro, M. W., Santos, D. M., Fukutani, K. F., Clarencio, J., Miranda, J. C., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Soto, M. & De Oliveira, C. I.** 2012. Vaccination with *L. infantum chagasi* nucleosomal histones confers protection against New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS One*, 7, e52296.
- Carrillo, E., Moreno, J. & Cruz, I.** 2013. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends Parasitol*, 29, 579-580.
- Carrion, J., Folgueira, C. & Alonso, C.** 2008. Transitory or long-lasting immunity to *Leishmania major* infection: The result of immunogenicity and multicomponent properties of histone DNA vaccines. *Vaccine*, 26, 1155-1165.
- Carrion, J., Folgueira, C., Soto, M., Fresno, M. & Requena, J. M.** 2011. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit Vectors*, 4, 150.

- Carrion, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D. R., Requena, J. M. & Alonso, C. 2006. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*, 28, 173-183.
- Carrion, J., Nieto, A., Soto, M. & Alonso, C. 2007. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 9, 735-743.
- Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M. & Ribeiro De Jesus, A. 2005. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol*, 61, 337-342.
- Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Fernandez, L., Moreno, J., Carrillo, E., Requena, J. M., Fichera, E., Reed, S. G., Coler, R. N., Kamhawi, S., Oliveira, F., Valenzuela, J. G., Gradoni, L., Glueck, R., Gupta, G. & Cordeiro-Da-Silva, A. 2017. Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005951.
- Cecilio, P., Perez-Cabezas, B., Santarem, N., Maciel, J., Rodrigues, V. & Cordeiro Da Silva, A. 2014. Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol*, 5, 480.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A. E. & Tacchini-Cottier, F. 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog*, 6, e1000755.
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., Breton, M., Ronet, C., Launois, P. & Tacchini-Cottier, F. 2007. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol*, 82, 288-299.
- Chavez-Fumagalli, M. A., Costa, M. A., Oliveira, D. M., Ramirez, L., Costa, L. E., Duarte, M. C., Martins, V. T., Oliveira, J. S., Olortegi, C. C., Bonay, P., Alonso, C., Tavares, C. A., Soto, M. & Coelho, E. A. 2010. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes Infect*, 12, 967-977.
- Chhajer, R. & Ali, N. 2014. Genetically modified organisms and visceral leishmaniasis. *Front Immunol*, 5, 213.
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Ivovic, V., Dedet, J. P., Pratlong, F., Dvorak, V. & Tselentis, Y. 2012. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek island of Crete. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 214-222.
- Coelho, V. T., Oliveira, J. S., Valadares, D. G., Chavez-Fumagalli, M. A., Duarte, M. C., Lage, P. S., Soto, M., Santoro, M. M., Tavares, C. A., Fernandes, A. P. & Coelho, E. A. 2012. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1430.
- Coler, R. N., Duthie, M. S., Hofmeyer, K. A., Guderian, J., Jayashankar, L., Vergara, J., Rolf, T., Misquith, A., Laurance, J. D., Raman, V. S., Bajor, H. R., Cauwelaert, N. D., Reed, S. J., Vallur, A., Favila, M., Orr, M. T., Ashman, J., Ghosh, P., Mondal, D. & Reed, S. G. 2015. From mouse

to man: Safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. *Clin Transl Immunology*, 4, e35.

- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V. & Reed, S. G. 2007. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun*, 75, 4648-4654.
- Colpitts, S. L., Dalton, N. M. & Scott, P. 2009. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62Lhigh central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 182, 5702-5711.
- Colpitts, S. L. & Scott, P. 2010. The early generation of a heterogeneous CD4+ T cell response to *Leishmania major*. *J Immunol*, 185, 2416-2423.
- Costa, C. H., Peters, N. C., Maruyama, S. R., De Brito, E. C., Jr., Santos, I. K. & Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis, V. 2011. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e943.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G. & Antoine, J. C. 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*, 33, 1373-1383.
- Crotty, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41, 529-542.
- Da Silva, R. & Sacks, D. L. 1987. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, 55, 2802-2806.
- Da Silva, R. A., Tavares, N. M., Costa, D., Pitombo, M., Barbosa, L., Fukutani, K., Miranda, J. C., De Oliveira, C. I., Valenzuela, J. G., Barral, A., Soto, M., Barral-Netto, M. & Brodskyn, C. 2011. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Trop*, 120, 185-190.
- Dantas-Torres, F. 2006. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101, 929-930.
- Davoudi, N., Khamesipour, A., Mahboudi, F. & McMaster, W. R. 2014. A dual drug sensitive *L. major* induces protection without lesion in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2785.
- De Mendonca, S. C., Cysne-Finkelstein, L. & Matos, D. C. 2015. Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. *Front Immunol*, 6, 524.
- De Moura, T. R., Novais, F. O., Oliveira, F., Clarencio, J., Noronha, A., Barral, A., Brodskyn, C. & De Oliveira, C. I. 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, 73, 5827-5834.
- De Oliveira, C. I. & Brodskyn, C. I. 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol*, 3, 145.
- De Souza Carmo, E. V., Katz, S. & Barbieri, C. L. 2010. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One*, 5, e13815.

- De Trez, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y. & Muraille, E. 2009. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog*, 5, e1000494.
- Deak, E., Jayakumar, A., Cho, K. W., Goldsmith-Pestana, K., Dondji, B., Lambris, J. D. & McMahon-Pratt, D. 2010. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol*, 40, 1355-1368.
- Den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*, 192, 1685-1696.
- Denise, H., Coombs, G. H. & Mottram, J. C. 2004. Generation of *Leishmania* mutants lacking antibiotic resistance genes using a versatile hit-and-run targeting strategy. *FEMS Microbiol Lett*, 235, 89-94.
- Dey, R., Dagur, P. K., Selvapandiyan, A., McCoy, J. P., Salotra, P., Duncan, R. & Nakhasi, H. L. 2013. Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. *J Immunol*, 190, 2138-2149.
- Dey, R., Joshi, A. B., Oliveira, F., Pereira, L., Guimaraes-Costa, A. B., Serafim, T. D., De Castro, W., Coutinho-Abreu, I. V., Bhattacharya, P., Townsend, S., Aslan, H., Perkins, A., Karmakar, S., Ismail, N., Karetnick, M., Meneses, C., Duncan, R., Nakhasi, H. L., Valenzuela, J. G. & Kamhawi, S. 2018. Gut microbes egested during bites of infected sand flies augment severity of leishmaniasis via inflammasome-derived IL-1beta. *Cell Host Microbe*, 23, 134-143 e136.
- Dey, R., Natarajan, G., Bhattacharya, P., Cummings, H., Dagur, P. K., Terrazas, C., Selvapandiyan, A., McCoy, J. P., Jr., Duncan, R., Satoskar, A. R. & Nakhasi, H. L. 2014. Characterization of cross-protection by genetically modified live-attenuated *Leishmania donovani* parasites against *Leishmania mexicana*. *J Immunol*, 193, 3513-3527.
- Dey, R. G., S.; Selvapandiyan, A.; Fiuza, J.; Duncan, R.; Nakhasi, H. L. 2014. Current status and future challenges for the development of genetically altered live attenuated *Leishmania* vaccines In: SATOSKAR A, D. R. (ed.) *Pathogenesis of leishmaniasis: New developments in research*. . New York: Springer Science+Business Media.
- Dominguez-Bernal, G., Martinez-Rodrigo, A., Mas, A., Blanco, M. M., Orden, J. A., De La Fuente, R. & Carrion, J. 2017. Alternative strategy for visceral leishmaniasis control: HisAK70-Salmonella Choleraesuis-pulsed dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 54, 13-19.
- Dostalova, A. & Volf, P. 2012. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, 5, 276.
- Dulbecco, R. & Freeman, G. 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8, 396-397.
- Dumetz, F., Imamura, H., Sanders, M., Seblova, V., Myskova, J., Pescher, P., Vanaerschot, M., Meehan, C. J., Cuypers, B., De Muylder, G., Spath, G. F., Bussotti, G., Vermeesch, J. R., Berriman, M., Cotton, J. A., Volf, P., Dujardin, J. C. & Domagalska, M. A. 2017. Modulation of aneuploidy in *Leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. *MBio*, 8.
- Duthie, M. S., Pereira, L., Favila, M., Hofmeyer, K. A., Reed, S. J., Metangmo, S., Townsend, S., Laurance, J. D., Picone, A., Misquith, A., Hossain, F., Ghosh, P., Khan, M. a. A., Guderian, J., Bailor, H. R., Liang, H., Vergara, J., Oliveira, F., Howard, R. F., Kamhawi, S., Mondal, D., Coler,

- R. N., Valenzuela, J. G. & Reed, S. G. 2017. A defined subunit vaccine that protects against vector-borne visceral leishmaniasis. *NPJ Vaccines*, 2, 23.
- Engwerda, C. R., Ato, M. & Kaye, P. M. 2004. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 20, 524-530.
- Engwerda, C. R. & Matlashewski, G. 2015. Development of *Leishmania* vaccines in the era of visceral leishmaniasis elimination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 109, 423-424.
- Faleiro, R. J., Kumar, R., Hafner, L. M. & Engwerda, C. R. 2014. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2914.
- Feijo, D., Tiburcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C. & Tavares, N. 2016. Dendritic cells and *Leishmania* infection: adding layers of complexity to a complex disease. *J Immunol Res*, 2016, 3967436.
- Fernandes, A. P., Costa, M. M., Coelho, E. A., Michalick, M. S., De Freitas, E., Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., Resende Dde, M., Hermont, V., Abrantes Cde, F. & Gazzinelli, R. T. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26, 5888-5895.
- Fiuza, J. A., Dey, R., Davenport, D., Abdeladhim, M., Meneses, C., Oliveira, F., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., Gannavaram, S. & Nakhasi, H. L. 2016. Intradermal immunization of *Leishmania donovani* centrin knock-out parasites in combination with salivary protein LJM19 from sand fly vector induces a durable protective immune response in hamsters. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004322.
- Fiuza, J. A., Gannavaram, S., Santiago Hda, C., Selvapandiyan, A., Souza, D. M., Passos, L. S., De Mendonca, L. Z., Lemos-Giunchetti Dda, S., Ricci, N. D., Bartholomeu, D. C., Giunchetti, R. C., Bueno, L. L., Correa-Oliveira, R., Nakhasi, H. L. & Fujiwara, R. T. 2015. Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine*, 33, 280-288.
- Folgueira, C., Carrion, J., Moreno, J., Saugar, J. M., Canavate, C. & Requena, J. M. 2008. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol*, 11, 81-89.
- Folgueira, C., Quijada, L., Soto, M., Abanades, D. R., Alonso, C. & Requena, J. M. 2005. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem*, 280, 35172-35183.
- Fulwiler, A. L., Soysa, D. R., Ullman, B. & Yates, P. A. 2011. A rapid, efficient and economical method for generating leishmanial gene targeting constructs. *Mol Biochem Parasitol*, 175, 209-212.
- Gallo, P., Goncalves, R. & Mosser, D. M. 2010. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett*, 133, 70-77.
- Ganguly, S., Das, N. K., Barbhuiya, J. N. & Chatterjee, M. 2010. Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview. *Int J Dermatol*, 49, 921-931.
- Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Dey, R., Ismail, N., Avishek, K., Salotra, P., Selvapandiyan, A., Satoskar, A. & Nakhasi, H. L. 2016. Methods to evaluate the preclinical safety and

- immunogenicity of genetically modified live-attenuated *Leishmania* parasite vaccines. *Methods Mol Biol*, 1403, 623-638.
- Gannavaram, S., Dey, R., Avishek, K., Selvapandiyan, A., Salotra, P. & Nakhasi, H. L.** 2014. Biomarkers of safety and immune protection for genetically modified live attenuated *Leishmania* vaccines against visceral leishmaniasis - discovery and implications. *Front Immunol*, 5, 241.
- Gannavaram, S., Torcivia, J., Gasparyan, L., Kaul, A., Ismail, N., Simonyan, V. & Nakhasi, H. L.** 2017. Whole genome sequencing of live attenuated *Leishmania donovani* parasites reveals novel biomarkers of attenuation and enables product characterization. *Sci Rep*, 7, 4718.
- Gardinassi, L. G. & De Miranda Santos, I. K.** 2016. Comment on "regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection" and further discussions about the role of antibodies in infections with *Leishmania*. *Parasit Vectors*, 9, 386.
- Geiger, A., Bossard, G., Sereno, D., Pissarra, J., Lemesre, J. L., Vincendeau, P. & Holzmüller, P.** 2016. Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from Trypanosomatids. *Front Immunol*, 7, 212.
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E. & Lauvau, G.** 2008. Blood monocytes: Distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*, 86, 398-408.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J. & De Miguel, A. G.** 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am J Trop Med Hyg*, 85, 820-825.
- Glennie, N. D. & Scott, P.** 2016. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. *Cell Immunol*, 309, 50-54.
- Glennie, N. D., Volk, S. W. & Scott, P.** 2017. Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. *PLoS Pathog*, 13, e1006349.
- Glennie, N. D., Yeramilli, V. A., Beiting, D. P., Volk, S. W., Weaver, C. T. & Scott, P.** 2015. Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. *J Exp Med*.
- Gollob, K. J., Antonelli, L. R. & Dutra, W. O.** 2005. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol*, 21, 347-350.
- Gollob, K. J., Viana, A. G. & Dutra, W. O.** 2014. Immunoregulation in human American leishmaniasis: Balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*, 36, 367-376.
- Goncalves-De-Albuquerque, S. D. C., Pessoa, E. S. R., Trajano-Silva, L. a. M., De Goes, T. C., De Moraes, R. C. S., Da, C. O. C. N., De Lorena, V. M. B. & De Paiva-Cavalcanti, M.** 2017. The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. *Front Immunol*, 8, 1437.
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A. & Mosser, D. M.** 2011. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med*, 208, 1253-1265.
- Gonzalez, E., Jimenez, M., Hernandez, S., Martin-Martin, I. & Molina, R.** 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit Vectors*, 10, 368.

- Gorak, P. M., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M.** 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*, 28, 687-695.
- Goto, Y., Bhatia, A., Raman, V. S., Vidal, S. E., Bertholet, S., Coler, R. N., Howard, R. F. & Reed, S. G.** 2009. *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against *L. major* infection. *Vaccine*, 27, 2884-2890.
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G. & Desjardins, M.** 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol*, 10, 100-111.
- Gueiros-Filho, F. J. & Beverley, S. M.** 1994. On the introduction of genetically modified *Leishmania* outside the laboratory. *Exp Parasitol*, 78, 425-428.
- Guha, R., Das, S., Ghosh, J., Naskar, K., Mandala, A., Sundar, S., Dujardin, J. C. & Roy, S.** 2013. Heterologous priming-boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania* (*Leishmania donovani*). *Vaccine*, 31, 1905-1915.
- Guillerey, C., Mouries, J., Polo, G., Doyen, N., Law, H. K., Chan, S., Kastner, P., Leclerc, C. & Dadaglio, G.** 2012. Pivotal role of plasmacytoid dendritic cells in inflammation and NK-cell responses after TLR9 triggering in mice. *Blood*, 120, 90-99.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. & Lambrecht, B. N.** 2014. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*, 14, 94-108.
- Gumy, A., Louis, J. A. & Launois, P.** 2004. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *Int J Parasitol*, 34, 433-444.
- Gupta, G., Oghumu, S. & Satoskar, A. R.** 2013. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*, 82, 155-184.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M. & Seder, R. A.** 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol*, 18, 927-974.
- Harrison, N., Walochnik, J., Ramsebner, R., Veletzky, L., Lagler, H. & Ramharter, M.** 2017. Progressive perforation of the nasal septum due to *Leishmania major*: A case of mucosal leishmaniasis in a traveler. *Am J Trop Med Hyg*, 96, 653-655.
- Hefnawy, A., Berg, M., Dujardin, J. C. & De Muylder, G.** 2017. Exploiting knowledge on *Leishmania* drug resistance to support the quest for new drugs. *Trends Parasitol*, 33, 162-174.
- Henri, S., Curtis, J., Hochrein, H., Vremec, D., Shortman, K. & Handman, E.** 2002. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*: inverse relationship to interleukin-12 production. *Infect Immun*, 70, 3874-3880.
- Hey, Y. Y. & O'Neill, H. C.** 2012. Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *J Cell Mol Med*, 16, 2611-2619.
- Hoffman, S. L., Billingsley, P. F., James, E., Richman, A., Loyevsky, M., Li, T., Chakravarty, S., Gunasekera, A., Chattopadhyay, R., Li, M., Stafford, R., Ahumada, A., Epstein, J. E., Sedegah,**

- M., Reyes, S., Richie, T. L., Lyke, K. E., Edelman, R., Laurens, M. B., Plowe, C. V. & Sim, B. K. 2010. Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent *Plasmodium falciparum* malaria. *Hum Vaccin*, 6, 97-106.
- Hosseini, S. M., Hatam, G. R. & Ardehali, S. 2005. Characterization of *Leishmania* isolated from unhealed lesions caused by leishmanization. *East Mediterr Health J*, 11, 240-243.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E. & Strych, U. 2016. New vaccines for the world's poorest people. *Annu Rev Med*, 67, 405-417.
- Hurrell, B. P., Schuster, S., Grun, E., Coutaz, M., Williams, R. A., Held, W., Malissen, B., Malissen, M., Yousefi, S., Simon, H. U., Muller, A. J. & Tacchini-Cottier, F. 2015. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. *PLoS Pathog*, 11, e1004929.
- Iborra, S., Carrion, J., Anderson, C., Alonso, C., Sacks, D. & Soto, M. 2005. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun*, 73, 5842-5852.
- Iborra, S., Martinez-Lopez, M., Cueto, F. J., Conde-Garrosa, R., Del Fresno, C., Izquierdo, H. M., Abram, C. L., Mori, D., Campos-Martin, Y., Reguera, R. M., Kemp, B., Yamasaki, S., Robinson, M. J., Soto, M., Lowell, C. A. & Sancho, D. 2016. *Leishmania* uses Mincle to target an inhibitory ITAM signaling pathway in dendritic cells that dampens adaptive immunity to infection. *Immunity*, 45, 788-801.
- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Alonso, C. & Requena, J. M. 2004. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 22, 3865-3876.
- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Nieto, A., Fernandez, E., Alonso, C. & Requena, J. M. 2003. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun*, 71, 6562-6572.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelen, J., Miron, C., Alonso, C. & Corraliza, I. 2002. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*, 24, 113-118.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Ishizuka, A. S., Lyke, K. E., Dezure, A., Berry, A. A., Richie, T. L., Mendoza, F. H., Enama, M. E., Gordon, I. J., Chang, L. J., Sarwar, U. N., Zephir, K. L., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., K, C. N., Murshedkar, T., Decederfelt, H., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J., Saunders, J. G., Laurens, M. B., Plowe, C. V., Flynn, B., Whalen, W. R., Todd, J. P., Noor, J., Rao, S., Sierra-Davidson, K., Lynn, G. M., Epstein, J. E., Kemp, M. A., Fahle, G. A., Mikolajczak, S. A., Fishbaugher, M., Sack, B. K., Kappe, S. H., Davidson, S. A., Garver, L. S., Bjorkstrom, N. K., Nason, M. C., Graham, B. S., Roederer, M., Sim, B. K., Hoffman, S. L., Ledgerwood, J. E. & Seder, R. A. 2016. Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nat Med*, 22, 614-623.



- Ismail, N., Kaul, A., Bhattacharya, P., Gannavaram, S. & Nakhasi, H. L. 2017. Immunization with live attenuated *Leishmania donovani* centrin(-/-) parasites is efficacious in asymptomatic infection. *Front Immunol*, 8, 1788.
- Jafari, I., Heravi Shargh, V., Shahryari, M., Abbasi, A., Jaafari, M. R., Khamesipour, A. & Badiie, A. 2017. Cationic liposomes formulated with a novel whole *Leishmania* lysate (WLL) as a vaccine for leishmaniasis in murine model. *Immunobiology*.
- Jeibouei, S., Bandehpour, M., Kazemi, B. & Haghighi, A. 2017. Designing a DNA vaccine-based *Leishmania major* polytope (preliminary report). *Iran J Parasitol*, 12, 441-445.
- Kaech, S. M. & Cui, W. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 12, 749-761.
- Kamhawi, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: Friends or foes? *Trends Parasitol*, 22, 439-445.
- Kane, M. M. & Mosser, D. M. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, 166, 1141-1147.
- Katara, G. K., Ansari, N. A., Singh, A., Ramesh, V. & Salotra, P. 2012. Evidence for involvement of Th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL). *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1703.
- Katebi, A., Gholami, E., Taheri, T., Zahedifard, F., Habibzadeh, S., Taslimi, Y., Shokri, F., Papadopoulou, B., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G. & Rafati, S. 2015. *Leishmania tarentolae* secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against *Leishmania major* infection in a susceptible BALB/c mice model. *Mol Immunol*.
- Kaye, P. & Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9, 604-615.
- Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S. & Engwerda, C. R. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*, 201, 239-253.
- Kebaier, C., Uzonna, J. E., Beverley, S. M. & Scott, P. 2006. Immunization with persistent attenuated Delta lpg2 *Leishmania major* parasites requires adjuvant to provide protective immunity in C57BL/6 mice. *Infect Immun*, 74, 777-780.
- Kedzierski, L. & Evans, K. J. 2014. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 1-19, 1-19.
- Khamesipour, A., Abbasi, A., Firooz, A., Mohammadi, A. M., Eskandari, S. E. & Jaafari, M. R. 2012. Treatment of cutaneous lesion of 20 years' duration caused by leishmanization. *Indian J Dermatol*, 57, 123-125.
- Khamesipour, A., Dowlati, Y., Asilian, A., Hashemi-Fesharki, R., Javadi, A., Noazin, S. & Modabber, F. 2005. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*, 23, 3642-3648.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F. & Modabber, F. 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*, 123, 423-438.

- Khan, S. M., Janse, C. J., Kappe, S. H. & Mikolajczak, S. A. 2012. Genetic engineering of attenuated malaria parasites for vaccination. *Curr Opin Biotechnol*, 23, 908-916.
- Klaus, B. 2016. Statistical relevance-relevant statistics, Part II: presenting experimental data. *EMBO J*, 35, 1726-1729.
- Kong, F., Saldarriaga, O. A., Spratt, H., Osorio, E. Y., Travi, B. L., Luxon, B. A. & Melby, P. C. 2017. Transcriptional profiling in experimental visceral leishmaniasis reveals a broad splenic inflammatory environment that conditions macrophages toward a disease-promoting phenotype. *PLoS Pathog*, 13, e1006165.
- Kreutzfeld, O., Muller, K. & Matuschewski, K. 2017. Engineering of genetically arrested parasites (GAPs) for a precision malaria vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 198.
- Kumar, H., Sattler, J. M., Singer, M., Heiss, K., Reinig, M., Hammerschmidt-Kamper, C., Heussler, V., Mueller, A. K. & Frischknecht, F. 2016. Protective efficacy and safety of liver stage attenuated malaria parasites. *Sci Rep*, 6, 26824.
- Kumar, R. & Engwerda, C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology*, 3, e13.
- Kumari, S., Kumar, A., Samant, M., Singh, N. & Dube, A. 2008. Discovery of novel vaccine candidates and drug targets against visceral leishmaniasis using proteomics and transcriptomics. *Curr Drug Targets*, 9, 938-947.
- Lakshmi, B. S.,; Madhubala, R. 2013. *Leishmania* vaccines: Past, present, and future. In: ALICIA PONTE-SUCRE, E. D., MARITZA PADRÓN-NIEVES (ed.) *Drug resistance in Leishmania parasites: Consequences, molecular mechanisms and possible treatments*. School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi 110067, India: Springer Science & Business Media.
- Larsen, M. H., Biermann, K., Chen, B., Hsu, T., Sambandamurthy, V. K., Lackner, A. A., Aye, P. P., Didier, P., Huang, D., Shao, L., Wei, H., Letvin, N. L., Frothingham, R., Haynes, B. F., Chen, Z. W. & Jacobs, W. R., Jr. 2009. Efficacy and safety of live attenuated persistent and rapidly cleared *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates in non-human primates. *Vaccine*, 27, 4709-4717.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G. & Solbach, W. 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, 213, 183-191.
- Lauring, A. S., Jones, J. O. & Andino, R. 2010. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol*, 28, 573-579.
- León, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C. 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 26, 519-531.
- Liu, D. & Uzonna, J. E. 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 83.
- Lodge, R. & Descoteaux, A. 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol*, 114, 256-265.

- Loeuillet, C., Bañuls, A. L. & Hide, M. 2016. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: Experimental considerations. *Parasit Vectors*, 9, 144.
- Lyke, K. E., Ishizuka, A. S., Berry, A. A., Chakravarty, S., Dezure, A., Enama, M. E., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Manoj, A., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., Kc, N., Murshedkar, T., Mendoza, F. H., Gordon, I. J., Zephir, K. L., Holman, L. A., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J., Saunders, J. G., Berkowitz, N. M., Flynn, B. J., Nason, M. C., Garver, L. S., Laurens, M. B., Plowe, C. V., Richie, T. L., Graham, B. S., Roederer, M., Sim, B. K., Ledgerwood, J. E., Hoffman, S. L. & Seder, R. A. 2017. Attenuated PfSPZ vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 2711-2716.
- Maia, Z., Lirio, M., Mistro, S., Mendes, C. M., Mehta, S. R. & Badaro, R. 2012. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1484.
- Mandell, M. A. & Beverley, S. M. 2016. Concomitant immunity induced by persistent *Leishmania major* does not preclude secondary re-infection: Implications for genetic exchange, diversity and vaccination. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004811.
- Mandell, M. A. & Beverley, S. M. 2017. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E801-E810.
- Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S., Svensson, M., Stager, S. & Kaye, P. M. 2008. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*, 29, 295-305.
- Marques-Da-Silva, E. A., Coelho, E. A., Gomes, D. C., Vilela, M. C., Masioli, C. Z., Tavares, C. A., Fernandes, A. P., Afonso, L. C. & Rezende, S. A. 2005. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol Res*, 98, 67-74.
- Martinez-Lopez, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R. & Sancho, D. 2015. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol*, 45, 119-129.
- Mccall, L. I., Zhang, W. W., Ranasinghe, S. & Matlashewski, G. 2013. Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 31, 1420-1425.
- Mcfarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J. & Tacchini-Cottier, F. 2008. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, 76, 532-541.
- McGwire, B. S. & Satoskar, A. R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, 107, 7-14.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Van Bortel, W., Zeller, H. & Alten, B. 2014. A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance. *J Vector Ecol*, 39, 72-77.

- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E. & Cheng, J.** 2001. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 69, 4719-4725.
- Mendez, S., Tabbara, K., Belkaid, Y., Bertholet, S., Verthelyi, D., Klinman, D., Seder, R. A. & Sacks, D. L.** 2003. Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infect Immun*, 71, 5121-5129.
- Mildner, A. & Jung, S.** 2014. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*, 40, 642-656.
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. & Mosser, D. M.** 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*, 201, 747-754.
- Miro, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L. & Oliva, G.** 2017. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. *Trends Parasitol*, 33, 718-730.
- Modabber, F.** 1989. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. *Parasitology*, 98 Suppl, S49-60.
- Modabber, F.** 2010. Leishmaniasis vaccines: Past, present and future. *Int J Antimicrob Agents*, 36 Suppl 1, S58-61.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G. & Alonso, C.** 2003. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 92, 1-13.
- Molina, R., Jimenez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martin-Martin, I., Sevillano, O., Melero, S. & Bernal, J.** 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*, 190, 268-271.
- Moore, G. E., Gerner, R. E. & Franklin, H. A.** 1967. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*, 199, 519-524.
- Moore, J. W., Beattie, L., Osman, M., Owens, B. M., Brown, N., Dalton, J. E., Maroof, A. & Kaye, P. M.** 2016. CD4+ recent thymic emigrants are recruited into granulomas during *Leishmania donovani* infection but have limited capacity for cytokine production. *PLoS One*, 11, e0163604.
- Moore, J. W., Moyo, D., Beattie, L., Andrews, P. S., Timmis, J. & Kaye, P. M.** 2013. Functional complexity of the *Leishmania* granuloma and the potential of in silico modeling. *Front Immunol*, 4, 35.
- Mou, Z., Li, J., Boussoffara, T., Kishi, H., Hamana, H., Ezzati, P., Hu, C., Yi, W., Liu, D., Khadem, F., Okwor, I., Jia, P., Shitaoka, K., Wang, S., Ndao, M., Petersen, C., Chen, J., Rafati, S., Louzir, H., Muraguchi, A., Wilkins, J. A. & Uzonna, J. E.** 2015. Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4+ T cells. *Sci Transl Med*, 7, 310ra167.

- Mougneau, E., Bihl, F. & Glaichenhaus, N. 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*, 240, 286-296.
- Mureev, S., Kushnir, S., Kolesnikov, A. A., Breitling, R. & Alexandrov, K. 2007. Construction and analysis of *Leishmania tarentolae* transgenic strains free of selection markers. *Mol Biochem Parasitol*, 155, 71-83.
- Murray, H. W., Mitchell-Flack, M., Zheng, H. & Ma, X. 2015. Granzyme-mediated regulation of host defense in the liver in experimental *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*, 83, 702-712.
- Mutiso, J. M., Macharia, J. C., Kiio, M. N., Ichagichu, J. M., Rikoi, H. & Gicheru, M. M. 2013. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J Biomed Res*, 27, 85-102.
- Muxel, S. M., Aoki, J. I., Fernandes, J. C. R., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuna, S. M., Muller, K. E., Vanderlinde, R. H. & Floeter-Winter, L. M. 2017. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. *Front Microbiol*, 8, 2682.
- Muyombwe, A., Olivier, M., Ouellette, M. & Papadopolou, B. 1997. Selective killing of *Leishmania* amastigotes expressing a thymidine kinase suicide gene. *Exp Parasitol*, 85, 35-42.
- Nadim, A. J., E.; Mohebbali, M. 1997. The experience of leishmanization in the Islamic Republic of Iran. *EMRO Journal Articles (EMHJ)*, 3, 284-289.
- Naucke, T. J., Menn, B., Massberg, D. & Lorentz, S. 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res*, 103 Suppl 1, S65-68.
- Nayak, A., Akpunarlieva, S., Barrett, M. & Burchmore, R. 2018. A defined medium for *Leishmania* culture allows definition of essential amino acids. *Exp Parasitol*, 185, 39-52.
- Nazzaro, G., Rovaris, M. & Veraldi, S. 2014. Leishmaniasis: a disease with many names. *JAMA Dermatol*, 150, 1204.
- Nguyen Hoang, A. T., Liu, H., Juarez, J., Aziz, N., Kaye, P. M. & Svensson, M. 2010. Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. *J Immunol*, 185, 2360-2371.
- Nieto, A., Dominguez-Bernal, G., Orden, J. A., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N. & Carrion, J. 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet Res*, 42, 39.
- Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P. G., Moulton, L. H., Nasser, K., Sharifi, I., Khalil, E. A., Bernal, I. D., Antunes, C. M., Kieny, M. P. & Tanner, M. 2008. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26, 6759-6767.
- Novais, F. O., Carvalho, L. P., Graff, J. W., Beiting, D. P., Ruthel, G., Roos, D. S., Betts, M. R., Goldschmidt, M. H., Wilson, M. E., De Oliveira, C. I. & Scott, P. 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 9, e1003504.
- Novais, F. O., Nguyen, B. T., Beiting, D. P., Carvalho, L. P., Glennie, N. D., Passos, S., Carvalho, E. M. & Scott, P. 2014. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis*, 209, 1288-1296.

- Novais, F. O., Santiago, R. C., Bafica, A., Khouri, R., Afonso, L., Borges, V. M., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., Barral, A. & De Oliveira, C. I. 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*, 183, 8088-8098.
- Novais, F. O. & Scott, P. 2015. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: The good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol*, 37, 251-259.
- Novais, F. O., Wong, A. C., Villareal, D. O., Beiting, D. P. & Scott, P. 2018. CD8(+) T cells lack local signals to produce IFN-gamma in the skin during *Leishmania* infection. *J Immunol*.
- Nylen, S., Maurya, R., Eidsmo, L., Manandhar, K. D., Sundar, S. & Sacks, D. 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med*, 204, 805-817.
- Nylen, S. & Sacks, D. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*, 28, 378-384.
- Okwor, I., Liu, D., Beverley, S. M. & Uzonna, J. E. 2009. Inoculation of killed *Leishmania major* into immune mice rapidly disrupts immunity to a secondary challenge via IL-10-mediated process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13951-13956.
- Okwor, I., Mou, Z., Liu, D. & Uzonna, J. 2012. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol*, 3, 128.
- Okwor, I. & Uzonna, J. 2008. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res*, 41, 123-136.
- Okwor, I. & Uzonna, J. 2016. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 94, 489-493.
- Oliva, G., Nieto, J., Foglia Manzillo, V., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Moreno, J., Chicharro, C., Carrillo, E., Butaud, T., Guegand, L., Martin, V., Cuisinier, A. M., McGahie, D., Gueguen, S., Canavate, C. & Gradoni, L. 2014. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3213.
- Opata, M. & Stephens, R. 2013. Early decision: effector and effector memory T cell differentiation in chronic infection. *Curr Immunol Rev*, 9, 190-206.
- Osman, M., Mistry, A., Keding, A., Gabe, R., Cook, E., Forrester, S., Wiggins, R., Di Marco, S., Colloca, S., Siani, L., Cortese, R., Smith, D. F., Aebischer, T., Kaye, P. M. & Lacey, C. J. 2017. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: first-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Negl Trop Dis*, 11, e0005527.
- Otranto, D. & Dantas-Torres, F. 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*, 29, 339-345.
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *J Infect*, 69 Suppl 1, S10-18.
- Pagan, A. J., Peters, N. C., Debrabant, A., Ribeiro-Gomes, F., Pepper, M., Karp, C. L., Jenkins, M. K. & Sacks, D. L. 2013. Tracking antigen-specific CD4+ T cells throughout the course of chronic *Leishmania major* infection in resistant mice. *Eur J Immunol*, 43, 427-438.

- Pakpour, N., Zaph, C. & Scott, P.** 2008. The central memory CD4<sup>+</sup> T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. *J Immunol*, 180, 8299-8305.
- Palatnik-De-Sousa, C. B.** 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26, 1709-1724.
- Palatnik-De-Sousa, C. B.** 2012. Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol*, 3, 69.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Breton, M., Kundig, C., Dumas, C., Fillion, I., Singh, A. K., Olivier, M. & Ouellette, M.** 2002. Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun*, 70, 62-68.
- Parody, N., Soto, M., Requena, J. M. & Alonso, C.** 2004. Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects BALB/c mice from infection. *Parasite Immunol*, 26, 283-293.
- Pereira, B. A. & Alves, C. R.** 2008. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*, 158, 239-255.
- Peters, N. & Sacks, D.** 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev*, 213, 159-179.
- Peters, N. C., Bertholet, S., Lawyer, P. G., Charmoy, M., Romano, A., Ribeiro-Gomes, F. L., Stamper, L. W. & Sacks, D. L.** 2012. Evaluation of recombinant *Leishmania* polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 189, 4832-4841.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. & Sacks, D.** 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321, 970-974.
- Peters, N. C., Kimblin, N., Secundino, N., Kamhawi, S., Lawyer, P. & Sacks, D. L.** 2009. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog*, 5, e1000484.
- Peters, N. C., Pagan, A. J., Lawyer, P. G., Hand, T. W., Henrique Roma, E., Stamper, L. W., Romano, A. & Sacks, D. L.** 2014. Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6c<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> effector T cells that are required for protection against re-infection. *PLoS Pathog*, 10, e1004538.
- Phillips, R., Svensson, M., Aziz, N., Maroof, A., Brown, N., Beattie, L., Signoret, N. & Kaye, P. M.** 2010. Innate killing of *Leishmania donovani* by macrophages of the splenic marginal zone requires IRF-7. *PLoS Pathog*, 6, e1000813.
- Ponte-Sucre, A., Diaz, E. & Padrón-Nieves, M.** 2012. *Drug resistance in Leishmania parasites: consequences, molecular mechanisms and possible treatments*, Springer Vienna.
- Porrozzi, R., Teva, A., Amaral, V. F., Santos Da Costa, M. V. & Grimaldi, G., Jr.** 2004. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Trop Med Hyg*, 71, 297-305.

- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., Roiz, D., Vergnes, B., Thierry, M., Rioux, J. A., Alten, B., Sereno, D. & Bañuls, A. L. 2015. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasit Vectors*, 8, 642.
- Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. & Requena, J. M. 1997. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* HSP70 genes. *J Biol Chem*, 272, 4493-4499.
- Rajakumar, S., Bleiss, W., Hartmann, S., Schierack, P., Marko, A. & Lucius, R. 2006. Concomitant immunity in a rodent model of filariasis: the infection of *Meriones unguiculatus* with *Acanthocheilonema viteae*. *J Parasitol*, 92, 41-45.
- Raman, V. S., Duthie, M. S., Fox, C. B., Matlashewski, G. & Reed, S. G. 2012. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Front Immunol*, 3, 144.
- Ramirez, L., Corvo, L., Duarte, M. C., Chavez-Fumagalli, M. A., Valadares, D. G., Santos, D. M., De Oliveira, C. I., Escutia, M. R., Alonso, C., Bonay, P., Tavares, C. A., Coelho, E. A. & Soto, M. 2014. Cross-protective effect of a combined L5 plus L3 *Leishmania major* ribosomal protein based vaccine combined with a Th1 adjuvant in murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 7, 3.
- Ramirez, L., Santos, D. M., Souza, A. P., Coelho, E. A., Barral, A., Alonso, C., Escutia, M. R., Bonay, P., De Oliveira, C. I. & Soto, M. 2013. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 31, 1312-1319.
- Ready, P. D. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15, 19505.
- Reed, S. G., Orr, M. T. & Fox, C. B. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*, 19, 1597-1608.
- Reguera, R. M., Moran, M., Perez-Pertejo, Y., Garcia-Estrada, C. & Balana-Fouce, R. 2016. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 227, 98-114.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. & Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596.
- Remer, K. A., Apetrei, C., Schwarz, T., Linden, C. & Moll, H. 2007. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur J Immunol*, 37, 2463-2473.
- Requena, J. M., Alonso, C. & Soto, M. 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today*, 16, 246-250.
- Requena, J. M., Lopez, M. C., Jimenez-Ruiz, A., De La Torre, J. C. & Alonso, C. 1988. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*, 16, 1393-1406.
- Restifo, N. P. & Gattinoni, L. 2013. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol*, 25, 556-563.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A. & Sacks, D. L. 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti- *Leishmania* response. *PLoS Pathog*, 8, e1002536.



- Ribeiro-Gomes, F. L., Roma, E. H., Carneiro, M. B., Doria, N. A., Sacks, D. L. & Peters, N. C. 2014. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect Immun*, 82, 2713-2727.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Romano, A., Lee, S., Roffe, E., Peters, N. C., Debrabant, A. & Sacks, D. 2015. Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8(+) T-cell priming in vitro by mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis*, 6, e2018.
- Rodrigues, A., Claro, M., Alexandre-Pires, G., Santos-Mateus, D., Martins, C., Valerio-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Pereira, M. A., Pereira Da Fonseca, I., Tomas, A. M. & Santos-Gomes, G. 2016a. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subsets of liver resident T lymphocyte. *Immunobiology*.
- Rodrigues, V., Cordeiro-Da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R. & Estaquier, J. 2016b. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*, 9, 118.
- Rodrigues, V., Laforge, M., Campillo-Gimenez, L., Soundaramourty, C., Correia-De-Oliveira, A., Dinis-Oliveira, R. J., Ouassii, A., Cordeiro-Da-Silva, A., Silvestre, R. & Estaquier, J. 2014. Abortive T follicular helper development is associated with a defective humoral response in *Leishmania infantum*-infected macaques. *PLoS Pathog*, 10, e1004096.
- Rogers, M. B., Downing, T., Smith, B. A., Imamura, H., Sanders, M., Svobodova, M., Volf, P., Berriman, M., Cotton, J. A. & Smith, D. F. 2014. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet*, 10, e1004092.
- Romano, A., Doria, N. A., Mendez, J., Sacks, D. L. & Peters, N. C. 2015. Cutaneous infection with *Leishmania major* mediates heterologous protection against visceral infection with *Leishmania infantum*. *J Immunol*, 195, 3816-3827.
- Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J. & Launois, P. 2010. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol*, 184, 886-894.
- Russell, P. K. & Halstead, S. B. 2016. Challenges to the design of clinical trials for live-attenuated tetravalent dengue vaccines. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, e0004854.
- Sacks, D. & Noben-Trauth, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2, 845-858.
- Sacks, D. L. 2014. Vaccines against tropical parasitic diseases: a persisting answer to a persisting problem. *Nat Immunol*, 15, 403-405.
- Sacks, D. L., Hieny, S. & Sher, A. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol*, 135, 564-569.
- Sacks, D. L. & Melby, P. C. 2015. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol*, 108, 19.12.11-24.
- Sacks, D. L. & Perkins, P. V. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, 223, 1417-1419.

- Saini, S., Ghosh, A. K., Das, S., Singh, R., Abhishek, K., Verma, S., Kumar, A., Mandal, A., Purkait, B., Sinha, K. K. & Das, P. 2018. Reduced pathogenicity of fructose-1,6-bisphosphatase deficient *Leishmania donovani* and its use as an attenuated strain to induce protective immunogenicity. *Vaccine*, 36, 1190-1202.
- Saljoughian, N., Taheri, T. & Rafati, S. 2014. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Front Immunol*, 5, 134.
- Santos Cda, S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., Tavares, N., Lordelo, M. J., Noronha, A., Costa, J., Borges, V. M., De Oliveira, C. I., Van Weyenbergh, J., Barral, A., Barral-Netto, M. & Brodskyn, C. I. 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNgamma(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*, 133, 1533-1540.
- Santos, D. M., Carneiro, M. W., De Moura, T. R., Soto, M., Luz, N. F., Prates, D. B., Irache, J. M., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., Espuelas, S., Borges, V. M. & De Oliveira, C. I. 2013. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine*, 9, 985-995.
- Saravia, N. G., Escorcia, B., Osorio, Y., Valderrama, L., Brooks, D., Arteaga, L., Coombs, G., Mottram, J. & Travi, B. L. 2006. Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine*, 24, 4247-4259.
- Sardar, A. H., Kumar, S., Kumar, A., Purkait, B., Das, S., Sen, A., Kumar, M., Sinha, K. K., Singh, D., Equbal, A., Ali, V. & Das, P. 2013. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. *J Proteomics*, 81, 185-199.
- Schenkel, J. M. & Masopust, D. 2014. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, 41, 886-897.
- Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J. A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S. & Bogdan, C. 2007. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med*, 204, 893-906.
- Schmid, M., Wege, A. K. & Ritter, U. 2012. Characteristics of "TIP-DCs and MDSCs" and their potential role in leishmaniasis. *Front Microbiol*, 3, 74.
- Scott, P., Artis, D., Uzonna, J. & Zaph, C. 2004. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev*, 201, 318-338.
- Scott, P. & Novais, F. O. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*.
- Secundino, N., Kimblin, N., Peters, N. C., Lawyer, P., Capul, A. A., Beverley, S. M., Turco, S. J. & Sacks, D. 2010. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell Microbiol*, 12, 906-918.
- Seder, R. A., Chang, L. J., Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., Holman, L. A., James, E. R., Billingsley, P. F., Gunasekera, A., Richman, A., Chakravarty, S., Manoj, A., Velmurugan, S., Li, M., Ruben, A. J., Li, T., Eappen, A. G., Stafford, R. E., Plummer, S. H., Hendel, C. S., Novik, L., Costner, P. J., Mendoza, F. H., Saunders, J. G., Nason, M. C., Richardson, J. H., Murphy, J., Davidson, S. A., Richie, T. L., Sedegah, M., Sutamihardja, A., Fahle, G. A., Lyke, K. E., Laurens, M. B., Roederer, M., Tewari, K., Epstein, J. E., Sim, B. K., Ledgerwood, J. E., Graham, B. S. &

- Hoffman, S. L. 2013. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science*, 341, 1359-1365.
- Selvapandiyan, A., Dey, R., Gannavaram, S., Lakhal-Naouar, I., Duncan, R., Salotra, P. & Nakhasi, H. L. 2012. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *J Trop Med*, 2012, 631460.
- Selvapandiyan, A., Dey, R., Nylen, S., Duncan, R., Sacks, D. & Nakhasi, H. L. 2009. Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 183, 1813-1820.
- Selvapandiyan, A., Duncan, R., Debrabant, A., Bertholet, S., Sreenivas, G., Negi, N. S., Salotra, P. & Nakhasi, H. L. 2001. Expression of a mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite. *J Biol Chem*, 276, 43253-43261.
- Shahbazi, M., Zahedifard, F., Taheri, T., Taslimi, Y., Jamshidi, S., Shirian, S., Mahdavi, N., Hassankhani, M., Daneshbod, Y., Zarkesh-Esfahani, S. H., Papadopoulou, B. & Rafati, S. 2015. Evaluation of live recombinant nonpathogenic *Leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinase and A2 genes as a candidate vaccine against experimental canine visceral leishmaniasis. *PLoS One*, 10, e0132794.
- Shields, G., And Sang, J.H. 1977. Improved medium for culture of *Drosophila* embryonic cells. *Drosophila Information Service*, 52, 161.
- Sibley, L. D. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev*, 240, 72-91.
- Silvestre, R., Cordeiro-Da-Silva, A. & Ouaisi, A. 2008. Live attenuated *Leishmania* vaccines: A potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56, 123-126.
- Silvestre, R., Cordeiro-Da-Silva, A., Santarem, N., Vergnes, B., Sereno, D. & Ouaisi, A. 2007. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. *J Immunol*, 179, 3161-3170.
- Singer, M. & Frischknecht, F. 2017. Time for genome editing: next-generation attenuated malaria parasites. *Trends Parasitol*, 33, 202-213.
- Singh, B. & Sundar, S. 2012. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine*, 30, 3834-3842.
- Singh, O. P., Hasker, E., Boelaert, M. & Sundar, S. 2016. Elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. *Lancet Infect Dis*, 16, e304-e309.
- Singh, O. P., Hasker, E., Sacks, D., Boelaert, M. & Sundar, S. 2014. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis*, 58, 1424-1429.
- Sissoko, M. S., Healy, S. A., Katile, A., Omaswa, F., Zaidi, I., Gabriel, E. E., Kamate, B., Samake, Y., Guindo, M. A., Dolo, A., Niangaly, A., Niare, K., Zeguime, A., Sissoko, K., Diallo, H., Thera, I., Ding, K., Fay, M. P., O'connell, E. M., Nutman, T. B., Wong-Madden, S., Murshedkar, T., Ruben, A. J., Li, M., Abebe, Y., Manoj, A., Gunasekera, A., Chakravarty, S., Sim, B. K. L., Billingsley, P. F., James, E. R., Walther, M., Richie, T. L., Hoffman, S. L., Doumbo, O. & Duffy, P. E. 2017. Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *Lancet Infect Dis*, 17, 498-509.

- Soong, L., Henard, C. A. & Melby, P. C.** 2012. Immunopathogenesis of non-healing american cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*, 34, 735-751.
- Soto, M., Corvo, L., Garde, E., Ramirez, L., Iniesta, V., Bonay, P., Gomez-Nieto, C., Gonzalez, V. M., Martin, M. E., Alonso, C., Coelho, E. A., Barral, A., Barral-Netto, M. & Iborra, S.** 2015. Coadministration of the three antigenic *Leishmania infantum* Poly (A) Binding Proteins as a DNA vaccine induces protection against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, e0003751.
- Soto, M., Ramírez, L., Pineda, M. A., González, V. M., Entringer, P. F., De Oliveira, C. I., Nascimento, I. P., Souza, A. P., Corvo, L., Alonso, C., Bonay, P., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M. & Iborra, S.** 2009. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection. *Scholarly Research Exchange*, 2009, 1-25.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L. & Alonso, C.** 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 36, 58-63.
- Spath, G. F., Lye, L. F., Segawa, H., Turco, S. J. & Beverley, S. M.** 2004. Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without lpg2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infect Immun*, 72, 3622-3627.
- Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J. & Singh, S.** 2016. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 9, 277.
- Stager, S., Alexander, J., Carter, K. C., Brombacher, F. & Kaye, P. M.** 2003. Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun*, 71, 4804-4807.
- Stager, S. & Rafati, S.** 2012. CD8(+) T cells in *Leishmania* infections: friends or foes? *Front Immunol*, 3, 5.
- Stanley, A. C. & Engwerda, C. R.** 2007. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*, 85, 138-147.
- Stephens, R. & Langhorne, J.** 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog*, 6, e1001208.
- Steverding, D.** 2017. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 10, 82.
- Stewart, J., Curtis, J., Spurck, T. P., Ilg, T., Garami, A., Baldwin, T., Courret, N., Mcfadden, G. I., Davis, A. & Handman, E.** 2005. Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase. *Int J Parasitol*, 35, 861-873.
- Stinson, E., Smith, L. P., Cole, K. S., Barry, E. M. & Reed, D. S.** 2016. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model. *Pathog Dis*, 74.
- Streit, J. A., Recker, T. J., Filho, F. G., Beverley, S. M. & Wilson, M. E.** 2001. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *J Immunol*, 166, 1921-1929.

- Struik, S. S. & Riley, E. M.** 2004. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev*, 201, 268-290.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K. & Rai, M.** 2006. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100 Suppl 1, S26-33.
- Sundar, S., Singh, A. & Singh, O. P.** 2014. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. *J Trop Med*, 2014, 646932.
- Sundar, S. & Singh, B.** 2014. Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 13, 489-505.
- Thalhofer, C. J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L. & Wilson, M. E.** 2011. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect Immun*, 79, 108-117.
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., De Freitas, L. A. & Beverley, S. M.** 1995. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10267-10271.
- Tonui, W. K. & Titus, R. G.** 2007. Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 579-584.
- Travi, B. L., Cordeiro-Da-Silva, A., Dantas-Torres, F. & Miro, G.** 2018. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*, 12, e0006082.
- Uzonna, J. E., Joyce, K. L. & Scott, P.** 2004a. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*, 199, 1559-1566.
- Uzonna, J. E., Spath, G. F., Beverley, S. M. & Scott, P.** 2004b. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol*, 172, 3793-3797.
- Uzonna, J. E., Wei, G., Yurkowski, D. & Bretscher, P.** 2001. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol*, 167, 6967-6974.
- Varani, S., Cagarelli, R., Melchionda, F., Attard, L., Salvadori, C., Finarelli, A. C., Gentilomi, G. A., Tigani, R., Rangoni, R., Todeschini, R., Scalone, A., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Viale, P. & Landini, M. P.** 2013. Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna province, Italy, November 2012 to May 2013. *Euro Surveill*, 18, 20530.
- Von Stebut, E. & Tenzer, S.** 2017. Cutaneous leishmaniasis: distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol*.
- Who** 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*, XII-XIII, 1-186, back cover, XII-XIII, 1-186, back cover.
- Who** 2014. Cutaneous leishmaniasis: Control in selected countries of the WHO Eastern Mediterranean and African regions. Report of an interregional network meeting, Casablanca, Morocco, . <http://www.who.int/iris/handle/10665/173804#sthash.qsddjbGM.dpuf>.

- Who** 2015a. Kala-azar elimination programme: Report of a WHO consultation of partners, Geneva, Switzerland, 10-11 february 2015.  
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/185042#sthash.H6pFZQEA.dpuf>.
- Who** 2015b. Visceral leishmaniasis: Control strategies and epidemiological situation update in east Africa: Report of a who bi-regional consultation Addis Ababa, Ethiopia, 9–11 march 2015.  
<http://apps.who.int/iris/handle/10665/190168#sthash.AvK0YDlp.dpuf>.
- Who** 2017. Global leishmaniasis update, 2006–2015: A turning point in leishmaniasis surveillance. *In*: POSTIGO, D. J. (ed.) *Weekly epidemiological record*. WHO.
- Wilson, H. L. & O'Neill, H. C.** 2003. Murine dendritic cell development: difficulties associated with subset analysis. *Immunol Cell Biol*, 81, 239-246.
- Wilson, M. E., Jeronimo, S. M. & Pearson, R. D.** 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*, 38, 147-160.
- Woelbing, F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C. & Von Stebut, E.** 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med*, 203, 177-188.
- Wu, W., Weigand, L., Belkaid, Y. & Mendez, S.** 2006. Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol*, 36, 3238-3247.
- Yamey, G. & Torreele, E.** 2002. The world's most neglected diseases. *BMJ*, 325, 176-177.
- Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S. M. & Scott, P.** 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med*, 10, 1104-1110.
- Zhang, X., An, J., Tu, A., Liang, X., Cui, F., Zheng, H., Tang, Y., Liu, J., Wang, X., Zhang, N. & Li, H.** 2016. Comparison of immune persistence among inactivated and live attenuated hepatitis a vaccines 2 years after a single dose. *Hum Vaccin Immunother*, 1-5, 1-5.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E.** 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-489.
- Zijlstra, E. E., El-Hassan, A. M., Ismael, A. & Ghalib, H. W.** 1994. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 51, 826-836.
- Zilberstein, D. & Shapira, M.** 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 48, 449-470.



# ANEXO I



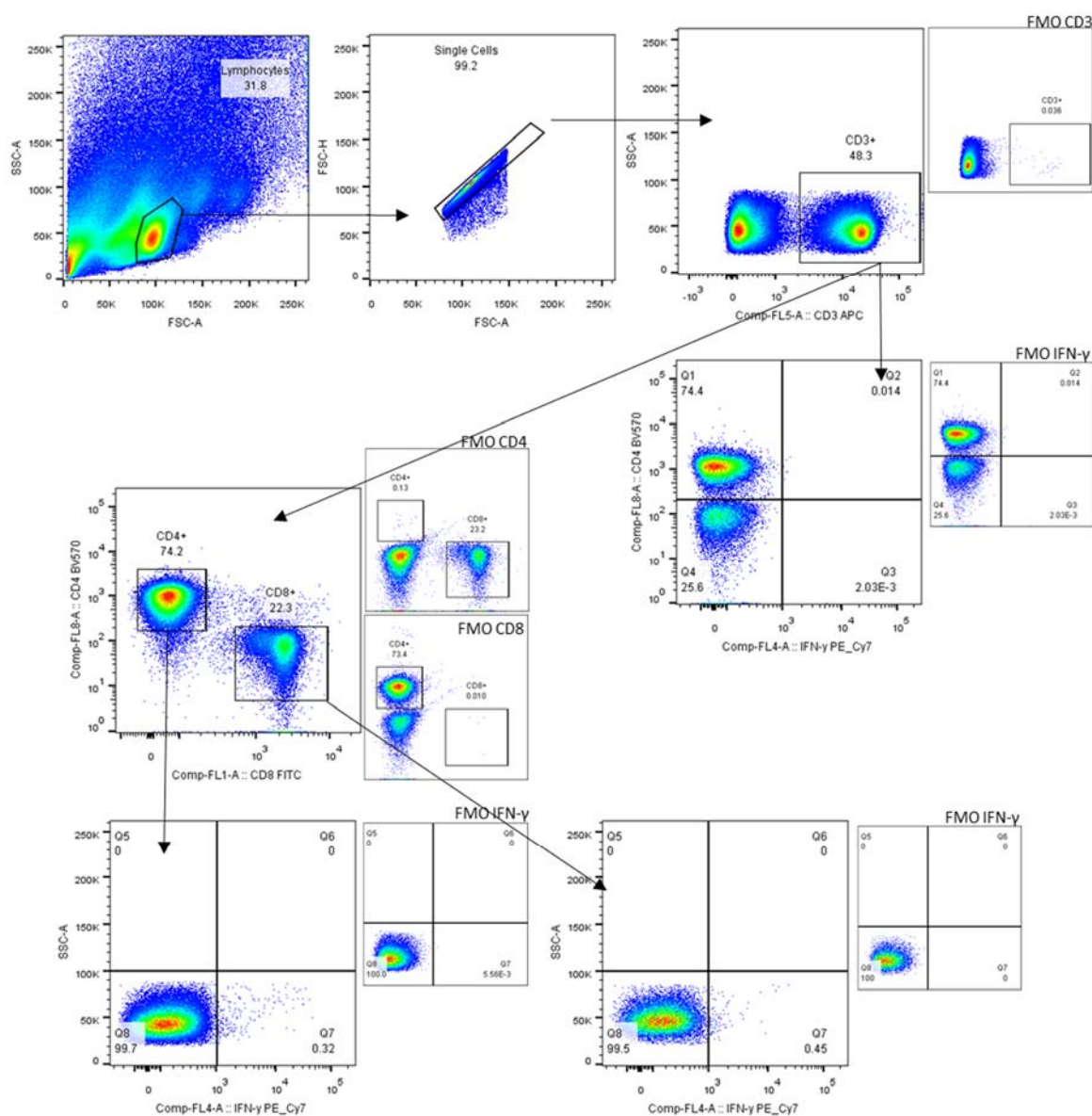


## ANEXO I. ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis de las poblaciones por citometría de flujo, se utilizaron controles de compensación y controles FMO (*Fluorescence Minus One*) que ayudaron al establecimiento de las distintas poblaciones en los paneles multiparamétricos. En los controles FMO se excluye el anticuerpo marcador de la población analizada para identificar la dispersión del resto de fluorocromos en los análisis multiparamétricos.

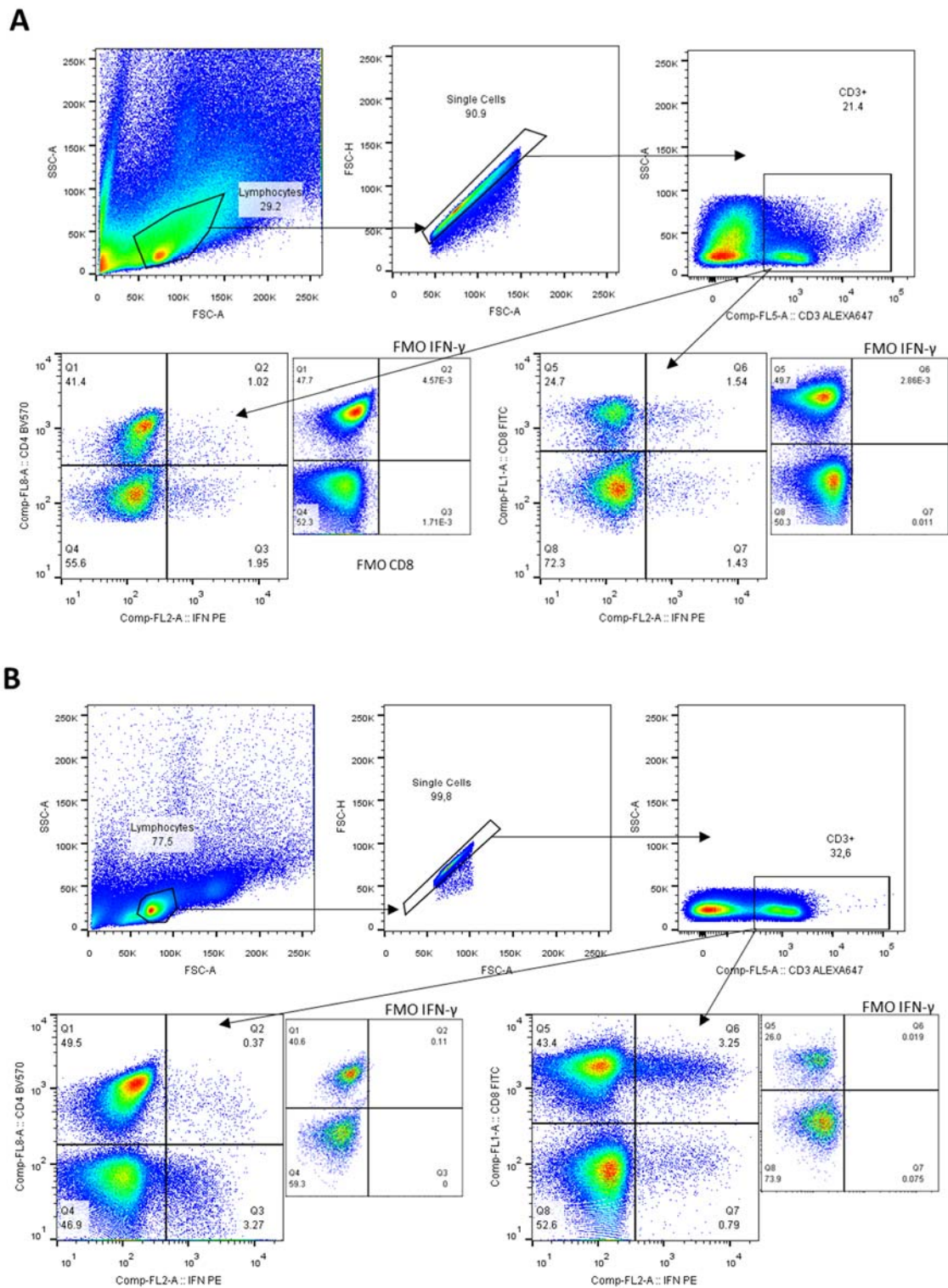
### 1. Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ en el bazo de ratón (Figura 4.4)

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  en el bazo de ratones vacunados con *Li $\Delta$ hsp70-II* se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 APC, anti-CD4 BV570, anti-CD8 FITC, anti-IFN- $\gamma$  PE/Cy7 y la siguiente estrategia de análisis.



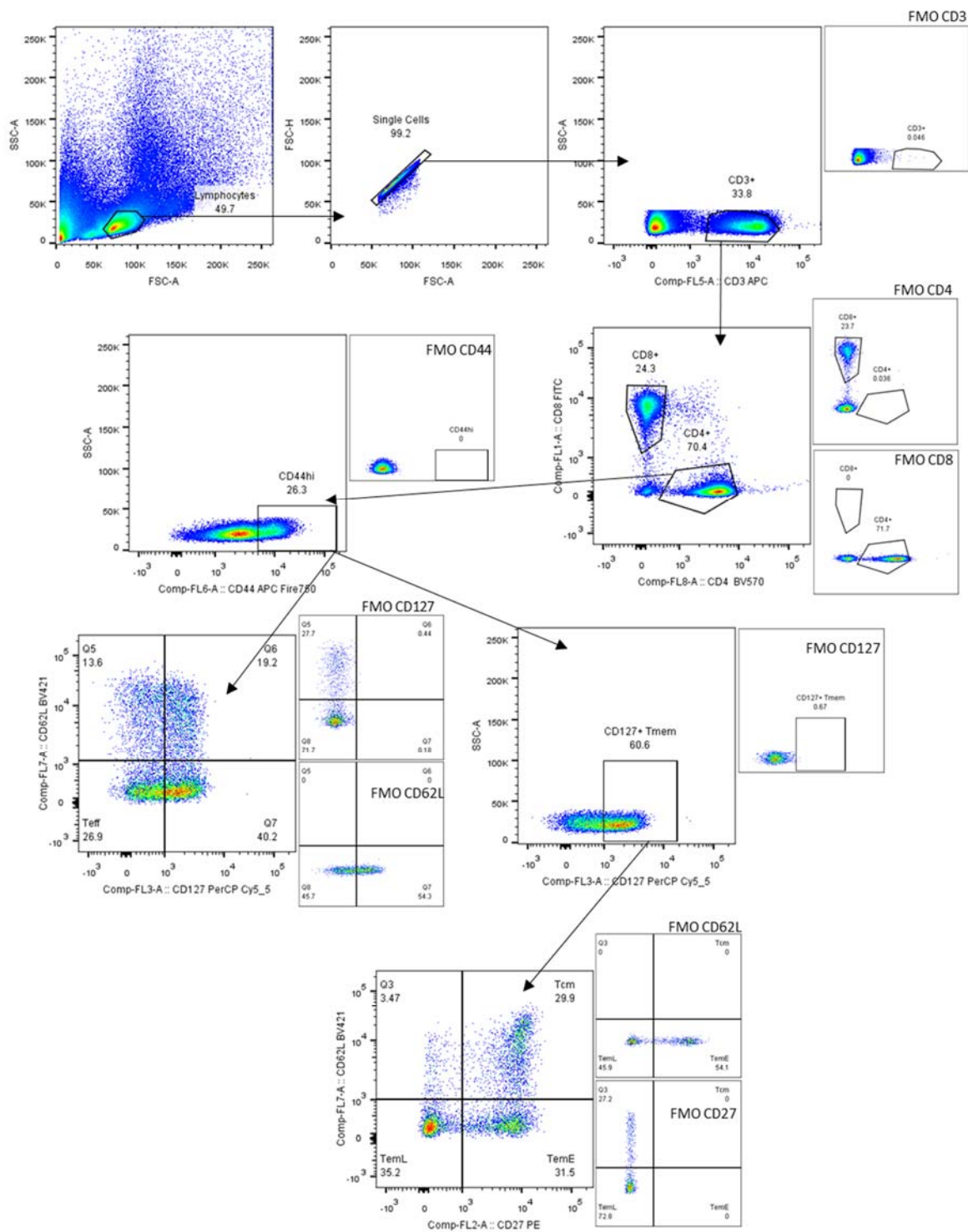
## 2. Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ en la oreja y ganglios submaxilares de ratón (Figura 4.13)

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  en la oreja (A) y ganglios submaxilares (B) de ratones C57BL/6 vacunados con *Li $\Delta$ hsp70-II* e infectados o no con *L. major* se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 APC, anti-CD4 BV570, anti-CD8 FITC, anti-IFN- $\gamma$  PE y la siguiente estrategia de análisis.



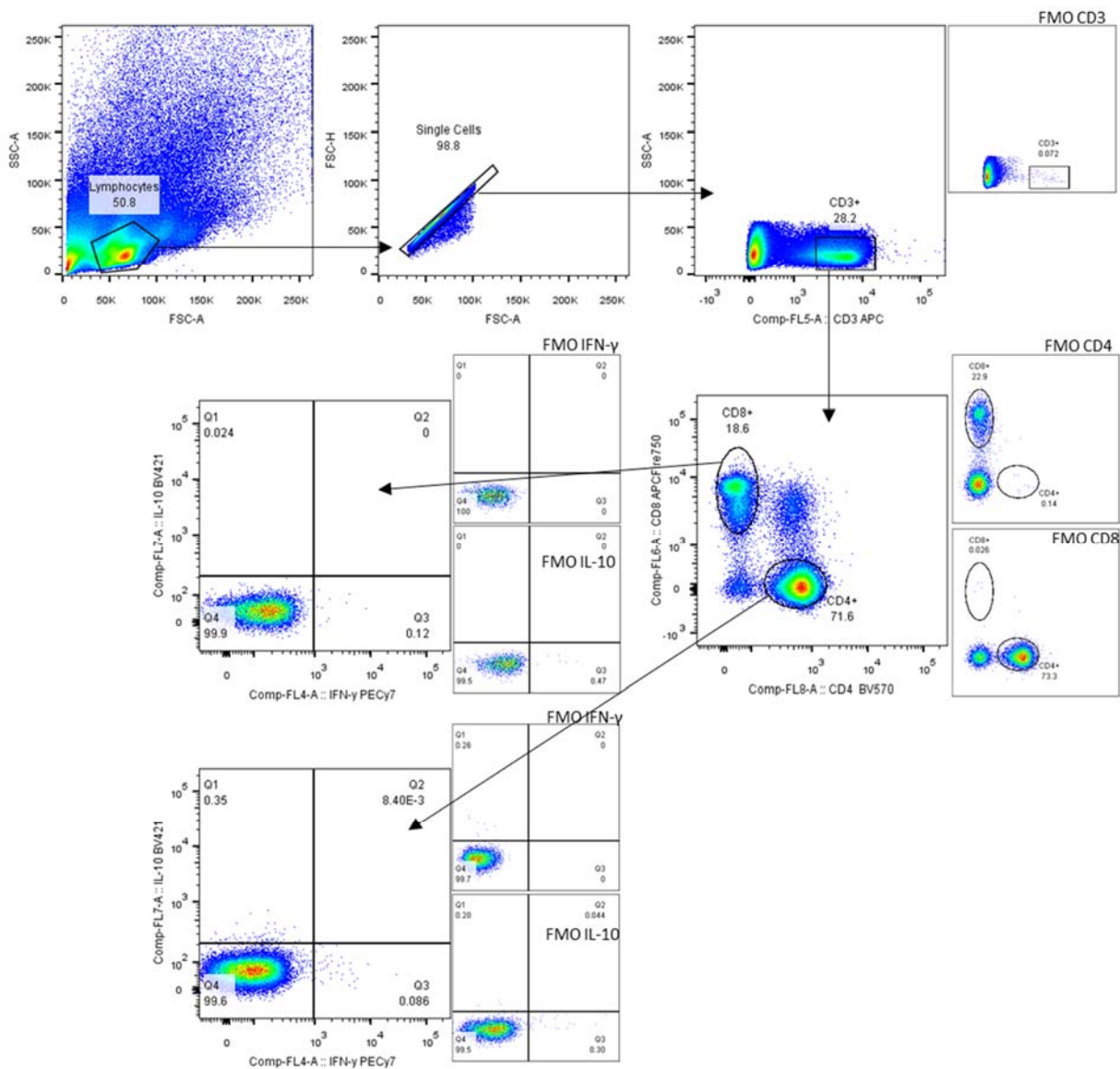
### 3. Linfocitos T efectores y de memoria en el bazo de ratones (Figura 4.18)

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos T efectores y de memoria (memoria central y memoria efectora) en el bazo de ratones BALB/c vacunados con *LiΔhsp70-II* e infectados *L. infantum* se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 APC, anti-CD4 BV570, anti-CD8 FITC, anti-CD44 APC/Fire750, anti-CD127 PerCP/Cy5.5, anti-CD62L BV421, anti-CD27 PE y la siguiente estrategia de análisis. Para simplificar el esquema únicamente se muestra el análisis realizado sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



#### 4. Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ e IL-10 en el bazo de ratón (Figura 4.20)

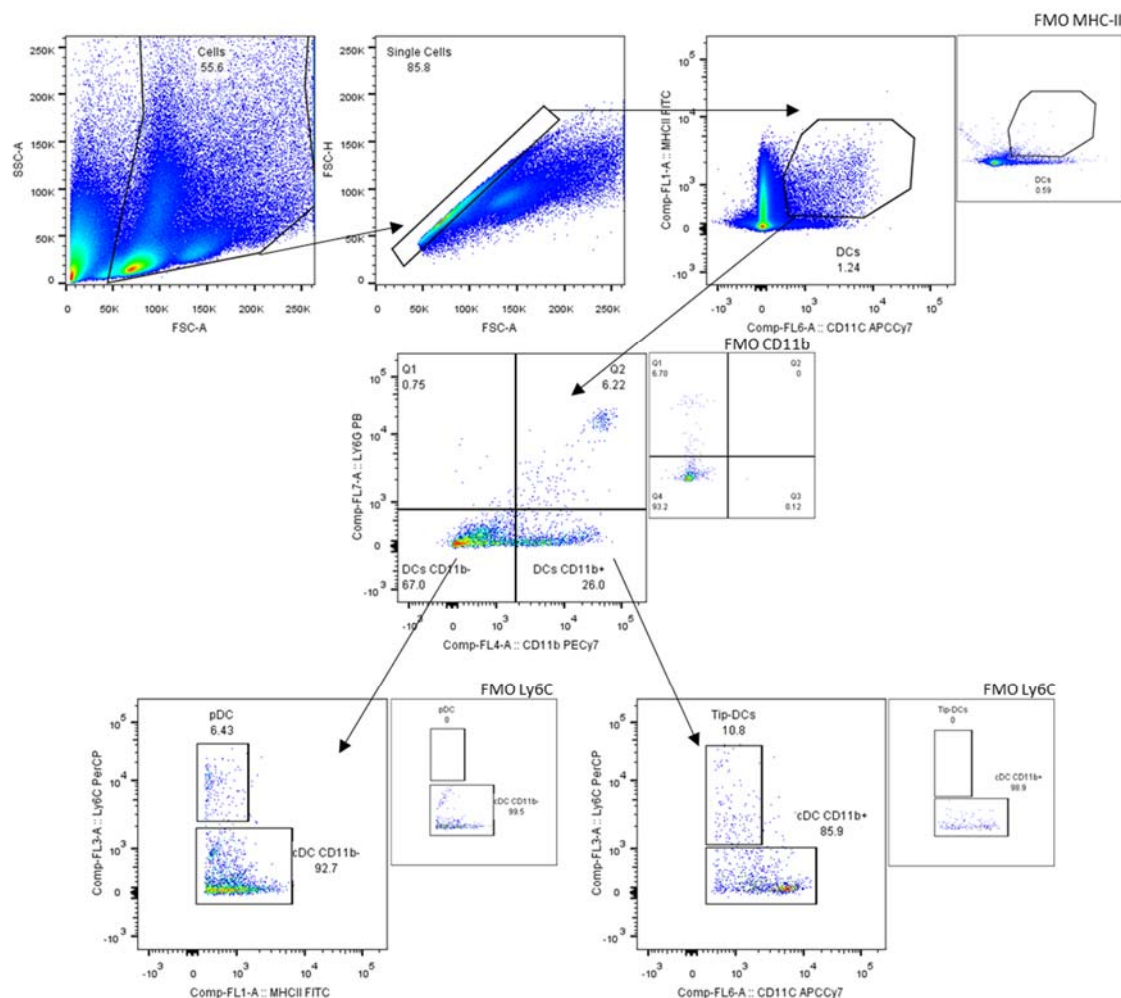
Para el análisis de las poblaciones de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  e IL-10 en el bazo ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* e infectados con *L. infantum* se utilizaron los anticuerpos anti-CD3 APC, anti-CD4 BV570, anti-CD8 FITC, anti-IFN- $\gamma$  PE/Cy7, anti-IL-10 BV421 y la siguiente estrategia de análisis.





## 5. Células dendríticas en el bazo de ratón (Figura 4.21)

Para el análisis de las poblaciones de células dendríticas en el bazo de ratones vacunados con *LiΔhsp70-II* e infectados con *L. infantum* se utilizaron los anticuerpos anti-MHC-II FITC, anti-Ly6C PerCP/Cy5.5, anti-CD11c APC/Cy7, anti-CD11b PE/Cy7, anti-Ly6G PB y la siguiente estrategia de análisis.





## ANEXO II





## ANEXO II. Generación de una cepa deficiente en el gen *hsp70-II* en *L. major*

Como un objetivo del proyecto de Tesis, se planteó la posibilidad de generar un mutante de delección para el gen *hsp70-II* en una especie distinta a *L. infantum*. Se eligió *L. major* por ser causante de patologías cutáneas leves y autolimitadas, una especie que además se ha venido utilizando en las campañas de leishmanización (Khamesipour et al., 2006). Además, hay indicios experimentales de que una exposición previa con parásitos de especies causantes de leishmaniosis cutánea puede conferir protección frente a la leishmaniosis visceral en humanos (Zijlstra et al., 1994, McCall et al., 2013).

Para eliminar el gen *hsp70-II* en *L. major* se transfectaron promastigotes de *L. major* con una secuencia de ADN formada por un casete de resistencia a antibiótico flanqueado por las regiones 5' y 3' adyacentes a la región codificante del gen *hsp70-II*, de forma que, mediante recombinación homóloga, el casete de resistencia sustituye a la región codificante de este gen. A continuación, se describen los pasos dados, los procedimientos seguidos y los resultados obtenidos.

### 1. Obtención de los clones pLmH70II-5UTR y pLmH70II-3UTR

En primer lugar, se extrajo el ADN genómico de *L. major* con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (Requena et al., 1988). A continuación, se amplificó un fragmento de 966 pb de la región corriente arriba a la región codificante del gen *hsp70-II* (UPR) en una reacción de PCR con la polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.) y los oligonucleótidos LmjF-H70II-5A y LmjF-H70II-5B T (Tabla 1). Para la obtención del fragmento corriente debajo de la región codificante (DWR), se realizó una PCR anidada utilizando en primer lugar la pareja de oligonucleótidos LmjF-H70II-3CN y LmjF-H70II-3D sobre el ADN genómico, y a continuación se utilizó el producto de amplificación como ADN molde para una segunda PCR con los oligonucleótidos LmjF-H70II-3C y LmjF-H70II-3DN (Tabla 1). Ambas reacciones se realizaron en presencia de un 3% de DMSO y con el tampón suministrado por el fabricante de la polimerasa para trabajar con regiones ricas en nucleótidos GC. La amplificación de ambos fragmentos se realizó en las siguientes condiciones de reacción: 30 s a 98 °C, 30 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 65 °C y 30 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de amplificación de los fragmentos UPR y DWR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y el ADN del tamaño esperado se aisló y purificó del gel con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega; Wisconsin, EE. UU.). A continuación, se realizó la ligación de los fragmentos de ADN con el vector pNZY28 con NZY-blunt PCR cloning kit (NZYTech; Lisboa, Portugal) y con el producto de ligación se transformaron bacterias *E. coli* XL1Blue, preparadas según el método de Inoue (Inoue et al., 1990). Se aisló el ADN plasmídico de las colonias seleccionadas

utilizando el kit comercial AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer; República de Corea) y se confirmó la correcta estructura de los clones pLmH70II-5UTR y pLmH70II-3UTR mediante el análisis de restricción y la secuenciación de los mismos (Parque Científico de Madrid).

Nombre	Secuencia 5' – 3'
LmjF-H70II-5A	GAGGCC <u>ACCTA</u> GGCC TGAGACCGACCCTCTTTCCT
LmjF-H70II-5B	GAGGCC <u>ACGCA</u> GGCC GGCAGTGGTCGTGTGTGTAT
LmjF-H70II-3C	GAGGCC <u>TCTGT</u> GGCC CCCCTGTAATGGACACCACC
LmjF-H70II-3D	GAGGCC <u>TGACT</u> GGCC AATTCGCTCTCTCGCACACA
LmjF-H70II-3CN	GAGGCC <u>TCTGT</u> GGCC GGAGGTCGACTAAATCGCTCG
LmjF-H70II-3DN	GAGGCC <u>TGACT</u> GGCC GATTGCTGAGCCAGCTTGC

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.** En la secuencia del oligonucleótido se indica la diana *SfiI* (subrayado) que fue incluida en cada amplicón, y se resaltan los nucleótidos que varían en cada uno de los sitios de restricción *SfiI* utilizados. Los oligonucleótidos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y resuspendidos a 10 µM para su uso.

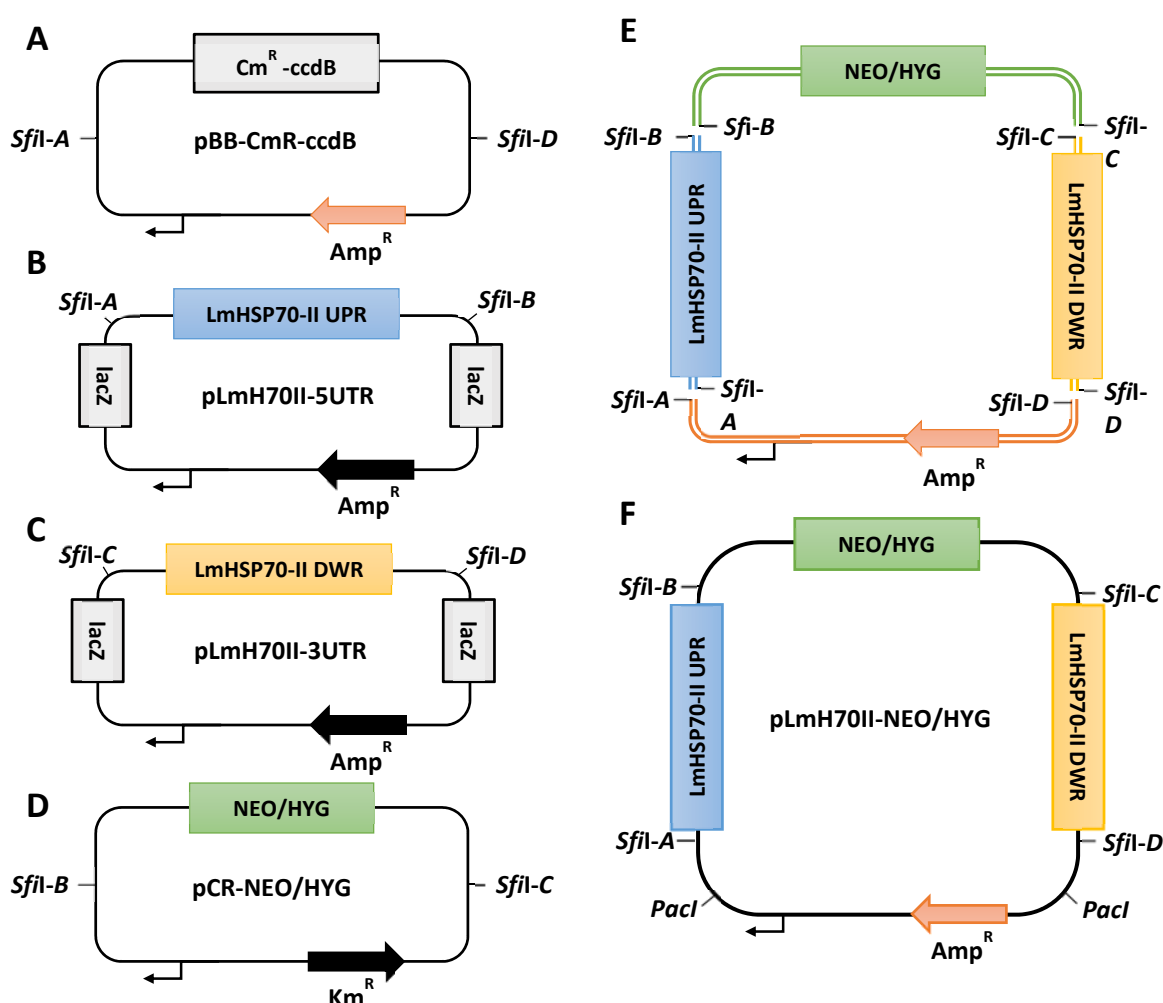
## 2. Obtención de los clones pLmH70II-NEO y pLmH70II-HYG

Para construir los clones pLmH70II-NEO y pLmH70II-HYG, que contienen el casete de resistencia NEO o HYG flaqueado por las regiones UPR y DWR del gen *hsp70-II* de *L. major*, se utilizó el sistema de ligación múltiple descrito por Fulwiller y colaboradores (Fulwiler et al., 2011), amablemente cedido por el Dr. Phillip Yates (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oregon Health & Science University, Portland). Brevemente, consiste en la utilización de vectores que contienen los distintos elementos de la construcción flaqueados por dianas de restricción *SfiI* (incluidas durante la obtención de estos elementos por PCR). La secuencia de reconocimiento *SfiI* es GGCCNNNNNGGCC y, tras el corte con la enzima de restricción, queda un extremo 3' asimétrico que sólo puede ligarse con un extremo 5' complementario, pero no consigo mismo u otras secuencias *SfiI* distintas. El diseño adecuado de estas dianas en los extremos de los elementos deseados permite una ligación totalmente dirigida y ordenada. Además, se trata de una diana de restricción que presenta una frecuencia de aparición muy baja en *Leishmania*, lo que permite su utilización en la mayoría de casos sin que corte en mitad de los elementos de la construcción.

Para obtener los distintos elementos que forman los vectores pLmH70II-NEO y pLmH70II-HYG, se digirieron con la enzima *SfiI* (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.) los clones pLmH70II-5UTR y pLmH70II-3UTR, el plásmido pCR-NEO o pCR-HYG y el plásmido pBB-CmR-ccdB que contiene el esqueleto del futuro vector (Figura 1). El ADN plasmídico digerido se sometió a una electroforesis y los fragmentos *SfiI* de interés se aislaron y purificaron del gel de agarosa. Se realizó una ligación múltiple de los fragmentos de ADN con la ligasa T4 (Thermo Fisher) y la construcción resultante se utilizó para

transformar bacterias de la cepa *E. coli* XL1Blue. La confirmación de la correcta estructura de los clones se realizó mediante análisis del tamaño de los fragmentos tras la digestión con *SfiI* y la secuenciación del ADN.

Finalmente, los clones pLmH70II-NEO y pLmH70II-HYG se digirieron con *PacI* (Thermo Fisher) para obtener el fragmento lineal con la construcción consistente en el marcador de resistencia y las regiones flanqueantes a la región codificante de *hsp70-II* de *L. major*. El producto de la digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y el ADN del tamaño correspondiente al de las construcciones lineales se aisló y purificó.



**Figura 1. Obtención de los clones pLmH70II-HYG y pLmH70II-NEO.** Para construir el vector portador del casete de resistencia NEO o HYG flanqueado por las regiones de homología UPR y DWR del gen *hsp70-II* (F), se realizó una ligación múltiple (E) con los fragmentos *SfiI* que contienen los distintos elementos: el esqueleto del vector (A), las regiones UPR y DWR del gen (B, C) y el casete de resistencia NEO o HYG (D). Adaptado de (Fulwiler et al., 2011).

### 3. Transfección de promastigotes de *L. major*

Las transfecciones se realizaron mediante la electroporación de  $5 \times 10^7$  promastigotes de *L. major* creciendo en fase logarítmica en medio M199c. Los parásitos se centrifugaron a  $1370 \times g$  durante 5 min y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la solución de electroporación Ingenio® (Mirus Bio LLC; Wisconsin, EE. UU.). Se añadió en un volumen de 10  $\mu$ l entre 2 y 5  $\mu$ g del ADN lineal (la construcción LmH70II-HYG o LmH70II-NEO digerida con *PacI*) y se llevó la mezcla a una cubeta de electroporación Gene Pulser®/MicroPulser™ de 0,2 cm de anchura (Bio-Rad; California, EE. UU.). La electroporación se realizó con el programa U-033 del electroporador Amaxa™ Nucleofector™ siguiendo las instrucciones del fabricante (Lonza; Basilea, Suiza).

Tras la electroporación, las células se transfirieron a una botella junto con 10 ml de M199c y se incubaron durante 24 h a 26 °C. Pasado ese tiempo, los promastigotes se recogieron y sembraron en placas con un medio semisólido de M199c-agar suplementado con los antibióticos de selección correspondientes: 20  $\mu$ g/ml geneticina y/o 50  $\mu$ g/ml higromicina (InvivoGen; California, EE. UU.). Las placas se incubaron a 26 °C hasta la aparición de colonias de parásitos.

### 4. Evaluación de la transfección y la correcta sustitución del gen *hsp70-II*

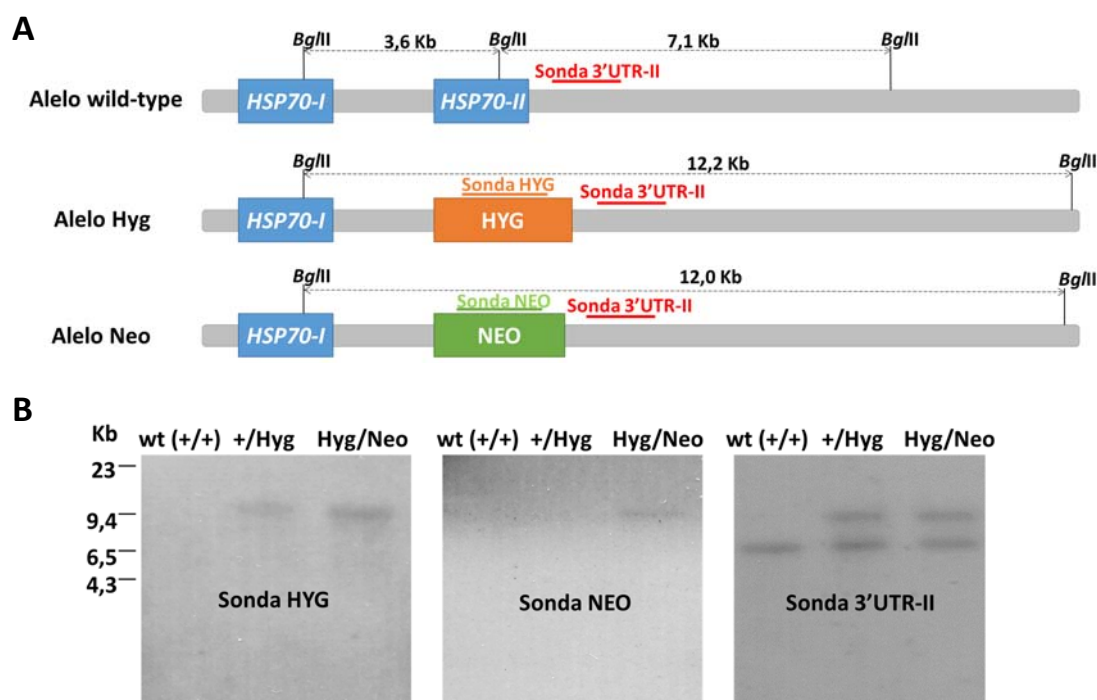
Para evaluar la correcta sustitución del gen *hsp70-II* por los casetes de resistencia HYG y NEO, el ADN genómico de los promastigotes transfectados capaces de crecer en el medio de selección fue extraído y digerido con la enzima de restricción *Bgl*II (Thermo Fisher; Massachusetts, EE. UU.). La digestión del ADN de *L. major* con *Bgl*II permite distinguir por el tamaño de los fragmentos los 3 tipos de alelos: el alelo salvaje con el gen *hsp70-II* (*wild-type*), el que sustituye el gen por el casete HYG y el que lo hace por el casete NEO (Figura 2A). El ADN digerido fue transferido mediante la técnica de Southern Blot a una membrana de Nylon-Roche con carga positiva (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania). La membrana se hibridó con sondas específicas para la determinación del tamaño de los fragmentos generados por *Bgl*II. La preparación y marcaje de las sondas, así como los ensayos de hibridación y el revelado de los resultados se realizó con el sistema de detección con digoxigenina DIG Nucleic Acid Detection Kit de Roche (Sigma-Aldrich; Darmstadt, Alemania). Las sondas utilizadas fueron:

- **Sonda LmH70 3'UTR-II.** Se sintetizó un fragmento de 776 pb mediante una PCR sobre el ADN plasmídico del clon pLmH70II-3UTR con los oligonucleótidos LmjF-H70II-3C y LmjF-H70II-3DN (Tabla 1) en las siguientes condiciones: 30 s a 98 °C, 30 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 65 °C y 30 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. La sonda hibrida específicamente con la región DWR del gen *hsp70-II* de *L. infantum*.
- **Sonda HYG.** Se sintetizó una sonda de 1604 pb sobre el ADN del vector pCR-HYG en una PCR de dos pasos con los oligonucleótidos HYG-5 (GGTTCGAAGATAGATCCGGAAGCCTG) e HYG-3

(CCCAAGCTTCTATTCTTTGCCCTCGGACG) y las siguientes condiciones: 30 s a 98 °C, 30 ciclos de 30 s a 98 °C, 12 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. La sonda hibrida específicamente a la región codificante del gen HYG.

- **Sonda NEO.** Se sintetizó una sonda de 792 pb sobre el ADN del vector pCR-NEO en una PCR de dos pasos con los oligonucleótidos NEO-5 (GGTTCGAAATTGAACAAGATGGATTGCA) y NEO-3 (CCCAAGCTTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG) y las siguientes condiciones: 30 s a 98 °C, 30 ciclos de 10 s a 98 °C, 12 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. La sonda se une específicamente a la región codificante del gen NEO.

El resultado obtenido utilizando la sonda HYG indica que la sustitución se produce correctamente y que después de transfectar la línea heterocigota con la construcción NEO el alelo HYG no se pierde (Figura 2B). Asimismo, la sonda NEO hibrida específicamente con el ADN de los parásitos transfectados con el casete NEO y el tamaño observado es el esperado. Sin embargo, cuando se utilizó la sonda 3'UTR-II se observó en los parásitos que tienen insertados correctamente los casetes HYG y NEO que el alelo salvaje aún se conserva, no siendo posible hasta el momento obtener una línea *knockout* para el gen *hsp70-II* (Figura 2B), a pesar de haberse intentado en múltiples ocasiones el doble reemplazamiento.



**Figura 2. Eliminación del gen *hsp70-II* de *L. major*.** Representación esquemática del locus HSP70 de *L. major* (A). Se indican los sitios de corte de la enzima *Bgl*II y el tamaño de los fragmentos obtenidos tras digerir con dicha enzima el ADN del parásito silvestre (*wild-type*) y del parásito portador de un alelo en el que se ha sustituido el gen *hsp70-II* por uno de los casetes de resistencia (HYG o NEO). El ADN digerido fue transferido a una membrana mediante Southern Blot. Los resultados de la hibridación con sondas marcadas con digoxigenina específicas para la región 3'UTR-II, el casete HYG y el casete NEO se muestran en (B).

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Fulwiler, A. L., Soysa, D. R., Ullman, B. & Yates, P. A.** 2011. A rapid, efficient and economical method for generating leishmanial gene targeting constructs. *Mol Biochem Parasitol*, 175, 209-212.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H.** 1990. High efficiency transformation of escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F. & Modabber, F.** 2006. Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian J Med Res*, 123, 423-438.
- Mccall, L. I., Zhang, W. W., Ranasinghe, S. & Matlashewski, G.** 2013. Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous leishmania donovani isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 31, 1420-1425.
- Requena, J. M., Lopez, M. C., Jimenez-Ruiz, A., De La Torre, J. C. & Alonso, C.** 1988. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*, 16, 1393-1406.
- Zijlstra, E. E., El-Hassan, A. M., Ismael, A. & Ghalib, H. W.** 1994. Endemic kala-azar in eastern Sudan: A longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 51, 826-836.

## Anexo III



